

Aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin

DISSERTATION

**Induktion von Autoimmunität durch
Kreuzreaktivität und „Bystander-
Aktivierung“ in transgenen Mäusen**

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Axel Nogai

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. PD Dr. med. Thomas Kamradt
2. Prof. Dr. med. Stefan Meuer
3. Prof. Dr. med. Hartmut Wekerle

Datum der Promotion: 22. November 2004

Induktion von Autoimmunität durch Kreuzreaktivität und „Bystander-Aktivierung“ in transgenen Mäusen

In der Arbeit wurde die Rolle von Bakterien für das Entstehen von Autoimmunität untersucht. Insbesondere wurde untersucht, inwieweit Bakterien entweder spezifisch (über „Kreuzreaktivität“) oder antigenunabhängig (über „Bystander-Aktivierung“) eine Aktivierung von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen induzieren können.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei dem untersuchten, MBP-spezifischen T-Zellrezeptor multiple, natürlich vorkommende, kreuzreaktive Peptide mikrobiellen Ursprungs gibt, die eine Aktivierung der T-Zellen hervorrufen und *in vivo* experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) induzieren können.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit Lipopolysaccharid (LPS) als unspezifischer Aktivator des Immunsystems eine Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen *in vitro* hervorrufen kann und inwieweit *in vivo* EAE durch LPS hervorgerufen werden kann.

Es wurde gezeigt, dass LPS *in vitro* einen kleinen Anteil der CD4⁺ T-Zellen aktiviert.

Wurden den transgenen T⁺α⁻-Mäusen LPS appliziert, erkrankten diese an EAE.

Somit gibt es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in den T⁺α⁻-Mäusen Hinweise für eine Relevanz von „Bystander-Aktivierung“.

Abschließend wurde diskutiert, inwieweit entweder „Kreuzreaktivität“ oder „Bystander-Aktivierung“ als Auslöser für Autoimmunität unter physiologischen Bedingungen in Frage kommt. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse wurde postuliert, dass keine der beiden Mechanismen alleiniger Auslöser sei, da es aufgrund der Häufigkeit von Infektionen, kreuzreaktiven Peptiden und des Vorkommens von autoreaktiven T-Zellen auch in gesunden Individuen ansonsten sehr viel häufiger zu Autoimmunität kommen müsste.

Unter bestimmten Bedingungen könnte die Aktivierung von T-Zellen über Kreuzreaktivität oder über „Bystander-Aktivierung“ Autoimmunität auslösen oder verstärken, wenn bereits andere Mechanismen des Immunsystems, die Autoimmunität verhindern, versagt haben.

Autoimmunität
Kreuzreaktivität
Bystander-Aktivierung
Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
T-Zellimmunität.

Induction of autoimmunity by cross-reactivity and „bystander-activation“ in transgenic mice

In this thesis the role of bacteria for the induction of autoimmunity was investigated. In detail, it was examined if bacteria activate autoreactive CD4⁺-T-cells antigen-specific („cross-reactivity“) or antigen-unspecific („bystander-activation“).

It was shown that the examined transgenic MBP-peptide specific T-cell-receptor recognized many natural occurring cross-reactive peptides of microbial origin, which induced an activation of the T-cells in vitro and which could induce autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the T-cell-receptor transgenic mice in vivo.

Furthermore, it was examined, whether lipopolysaccharide (LPS) as activator of the innate immune system could induce an unspecific activation of the autoreactive T-cells in vitro and whether administration of LPS in the transgenic mice could induce EAE in vivo.

It was shown that LPS activates a small percentage of CD4⁺ - T-cells.

Application of LPS to the transgenic T+alpha- mice induced EAE.

Therefore, the role of bystander-activation was indicated in vitro and in vivo.

Finally, it was discussed, whether either cross-reactivity or bystander-activation could be sufficient for inducing autoimmunity under physiologic conditions.

Due to the results presented in this work, it is postulated that none of the both mechanisms could be inductor of autoimmunity alone. If one of these mechanisms was sufficient, autoimmunity in humans should be a frequent event, because infections and autoreactive T cells are both findings which occur in healthy humans very often.

However, under certain conditions either cross-reactivity or bystander-activation could trigger or exacerbate autoimmunity, when other mechanisms which inhibit autoimmunity have failed.

Autoimmunity
Cross-reactivity
Bystander-activation
Experimental autoimmune encephalomyelitis
T cell immunity.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	7
1.1	Historischer Abriss	8
1.2	MHC-Moleküle und deren Aufgabe	10
1.3	Die Reifung der T-Zellen	12
1.4	Autoimmunkrankheiten	14
1.5	Hypothesen zum Entstehen von Autoimmunität	15
1.5.1	Autoantigen wird im Thymus nicht präsentiert	15
1.5.2	Zusammenbruch immunologischer Schranken	16
1.5.3	Expression zweier T-Zellrezeptoren auf einer T-Zelle	17
1.5.4	Autoimmunität durch antigenunabhängige T-Zellaktivierung	18
1.6	Experimentell autoimmune Enzephalomyelitis	21
1.6.1	Historische Entwicklung des Modells	22
1.6.2	Charakteristika des Modells	23
1.6.3	Die Wirkung der Adjuvantien	24
1.6.4	Die Rolle der CD4 ⁺ T-Zellen	25
1.6.5	T-Zellrezeptor transgene Mäuse und EAE	26
2	Ziel der Arbeit	28
3	Materialien und Methoden	29
3.1	Materialien	29
3.1.1	Chemikalien und Zusätze	29
3.1.2	Medien und Lösungen	30
3.1.3	Materialien	30
3.1.4	Mäuse	31
3.1.5	Bakterien	31
3.1.6	Peptide	32
3.1.7	Antikörper	32
3.2	Methoden	34
3.2.1	Zellbiologische Methoden	34
3.2.2	Methoden zur EAE Induktion	46
3.2.3	Histologische Methoden	49

4	Resultate	51
4.1	Übersicht	51
4.2	Das Supertop des T ⁺ α ⁻ T-Zellrezeptors	51
4.3	Mikrobielle, kreuzreaktive Peptide	54
4.4	Charakterisierung der T-Zellantwort auf ausgewählte mikrobielle Peptide	55
4.4.1	Mikrobielle Peptide induzieren Proliferation von T ⁺ α ⁻ Milzzellen	57
4.4.2	Zytokinproduktion T ⁺ α ⁻ Milzzellen induziert durch mikrobielle Peptide	58
4.4.3	Induktion von EAE durch mikrobielle Peptide	60
4.5	Induktion von EAE durch „Bystander Activation“	61
4.5.1	Antwort der T-Zellen auf Lysate von <i>S. typhimurium</i>	61
4.5.2	<i>In vitro</i> Antwort der T-Zellen auf LPS im Vergleich zu Lysaten und Peptiden	62
4.5.3	<i>In vivo</i> Antwort der T-Zellen auf LPS und bakterielle Lysate	68
4.5.4	Histologien LPS- und MBP –immunisierter Mäuse	69
4.5.5	T-Zellabhängige Induktion von EAE durch LPS	70
5	Diskussion	72
5.1	Aussagen über Molekulare Mimikry	72
5.1.1	Aussagen über die Spezifität des T-Zellrezeptors	72
5.1.2	Konsequenzen für das Verständnis der T-Zellrezeptor-Antigen-Erkennung	75
5.1.3	Hypothetisches Konzept zum Verständnis des Immunsystems bei eingeschränkter Spezifität des T-Zellrezeptors	75
5.1.4	Molekulare Mimikry – Auslöser für Autoimmunität?	78
5.1.5	Methoden zur Definition eines Supertops	79
5.1.6	Diskussion des verwendeten Mausmodells	81
5.2	Aussagen über Bystander-Aktivierung	82
5.2.1	Definition der Bystander-Aktivierung	82
5.2.2	Bystander-Aktivierung als Auslöser CD4 ⁺ -T-Zellvermittelter Autoimmunität	86
5.2.3	Bystander-Aktivierung – Ergebnisse dieser Arbeit	87
5.2.4	Ergebnisse von Bystander-Aktivierung <i>in vivo</i>	91
5.3	Ausblick: Autoimmunität durch Bakterien	93
6	Zusammenfassung: Infektion und Autoimmunität	95

1 Einführung

Jeder Organismus befindet sich in einer ständigen Auseinandersetzung mit seiner Umwelt. Insbesondere Parasiten, Bakterien und Viren, welche die körperliche Integrität des Organismus stören, stellen eine große Bedrohung dar. Im Verlauf der Evolution hat sich ein System von hochspezialisierten Zellen gebildet, das imstande ist, Mikroorganismen innerhalb des Körpers zu erkennen, zu bekämpfen und abzutöten. Dieses System wird Immunsystem genannt.

Wesentlich für dieses Immunsystem ist die Unterscheidung von lebensnotwendigem „Selbst“ und potentiell schädlichem „Fremd“. Diese Unterscheidung wird von dem Immunsystem meist effizient bewerkstelligt.

Bei einigen Individuen missdeutet das Immunsystem jedoch körpereigene Strukturen als fremd. Dieses Ereignis, bei welchem gesundes, unter Umständen lebensnotwendiges Gewebe zerstört wird, wird „Autoimmunität“ genannt.

Krankheiten wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 1, rheumatoide Arthritis oder multiple Sklerose (MS) werden zu dem Formenkreis der Autoimmunkrankheiten gezählt. Jedoch sind die Gründe für das Entstehen von Autoimmunität größtenteils noch unbekannt.

Da beobachtet wurde, dass Infektionen dem Auftreten der Autoimmunität häufig vorangehen, wird ein Zusammenhang zwischen beiden Ereignissen vermutet. Andererseits werden in von autoimmunen Prozessen geschädigtem Gewebe meist keine Erreger gefunden. Deswegen wird angenommen, dass die Infektion das Immunsystem fehlleitet. Es gibt, neben anderen, zwei Hypothesen, die den Wirkmechanismus einer solchen Fehlleitung zu erklären versuchen: Zum einen die Hypothese der „molekularen Mimikry“, die besagt, dass bestimmte Infektionserreger körpereigenen Strukturen ähnlich sehen und so das Immunsystem fehlleiten. Zum zweiten die Hypothese der „Bystander-Aktivierung“. Diese besagt, dass autoreaktive T-Zellen T-zellrezeptorunabhängig stimuliert werden können, wenn andere Zellen sie durch Zytokine aktivieren, die bei einer Infektion freierwerden.

Das Ziel dieser Studie ist die Untersuchung dieser Hypothesen.

1.1 Historischer Abriss

Die Erforschung des Immunsystems begann mit der Erkenntnis, dass nach Überleben gewisser Krankheiten ein lebenslanger Schutz vor diesen Krankheiten besteht. Diese Erkenntnis nutzte Jenner 1796 zur Entwicklung der Pockenvakzinierung. Nach der Entdeckung und Erforschung der Pathogenität der Bakterien durch Robert Koch im Jahre 1876 am Beispiel des Milzbrandes gelang es Pasteur, eine zweite Impfung gegen die von Viren übertragende Tollwut zu entwickeln. Obwohl diese mit den im Folgenden entwickelten Impfungen große Erfolge beim Induzieren einer spezifischen Immunantwort darstellten, geschah dies ohne genaues Verständnis des Immunsystems.

Interessanterweise kam es schon bei der von Pasteur entwickelten Vakzinierung gegen Tollwut zu den Impfwischenfällen, aus denen schließlich das Modell entwickelt wurde, auf dem diese Arbeit beruht[1].

Die Frage war, ob das Erkennen von körperfremden Substanzen angeboren sei, oder ob es sich im Laufe einer Immunreaktion erst entwickelt. Das System, welches „anpassungsfähige“ Immunantworten hervorruft, wurde in dem Begriff „adaptive Immunität“ im Gegensatz zur „angeborenen Immunität“ zusammengefasst. Man erkannte, dass der Grund bei der Entwicklung von Immunität nicht allein in dem Vorhandensein einer ererbten „Kenntnis“ aller pathogenen Organismen liegen kann, sondern dass es ein flexibles und wandelbares System geben muss, da unzählige Krankheitserreger vorkommen, gegen die sich Immunität entwickeln kann, und da industrielle Substanzen, die wahrscheinlich im Verlauf der Evolution noch nie eine wesentliche Rolle spielten, wie p-Phenylendiamin oder Nickelsulfat, trotzdem eine starke Immunantwort hervorrufen können.

Besonders zwei Hypothesen zur adaptiven Immunität wurden diskutiert: Die erste wurde personifiziert durch Emil von Behring und Shibasabaro Kitasato, die zeigen konnten, dass man einen Schutz vor Krankheiten durch das Übertragen von Blutserum von einem Individuum auf ein anderes übertragen kann. Nach diesen Befunden sollten lösliche Substanzen in Blut und anderen Körperflüssigkeiten, sogenannte Antikörper, für den Schutz gegen Fremdorganismen verantwortlich sei (sogenannte „humorale Immunität“)[2]. Die Erkenntnisse, die man bei der Untersuchung dieses Phänomens gewann, konnten bei der Entwicklung von passiven Immunisierungen durch körperfremdes Serum weiterentwickelt werden.

Auf der anderen Seite vertrat Elie Metchnikoff die These, dass Immunität durch spezialisierte Zellen vermittelt werde (sogenannte „zelluläre Immunität“). Er stützte sich auf seine Entdeckung von Zellen, die in der Lage sind, Bakterien aufzunehmen („phagozytieren“) und abzutöten[3].

1903 wurde schließlich von Almroth Wright die Verbindung beider Systeme durch Entdeckung der Phagozytose anregende („opsonierende“) Wirkung von Antikörpern vorgenommen[4]. Dennoch wird aus systematischen Gründen die Einteilung beibehalten. Die Prinzipien der humoralen und der zellulären Immunität kommen sowohl in der angeborenen wie auch in der adaptiven Immunität vor: Zur angeborenen, humoralen Immunität werden beispielsweise die im Serum gelösten Komplementfaktoren gezählt, die in der Lage sind, Bakterien zu zerstören, wenn an diese Antikörper gebunden haben. Zur adaptiven, humoralen Immunität werden die Antikörper gezählt. Solche Antikörper werden nach einer Infektion von B-Lymphozyten (im Folgenden kurz B-Zellen genannt) produziert, wobei die B-Zellen im Verlauf einer solchen Infektion die Antikörper laufend verändern. Da gleichzeitig nur die B-Zellen überleben, deren Antikörper besonders gut an das Antigen binden, entstehen Antikörper, die mit hoher Spezifität an die Infektion verursachenden Mikroben binden. Die Fremdorganismen werden dann beispielsweise durch das Komplementsystem oder durch Makrophagen unschädlich gemacht.

Das Korrelat der zellulären Form der adaptiven Immunität sind besonders die T-Zellen, die direkt Zellen zerstören, die von Viren oder intrazellulären Mikroben befallen oder maligne entartet sind, oder die andere Zellen, wie zum Beispiel B-Zellen und Makrophagen, aktivieren und somit eine Immunantwort induzieren können.

Während des Zweiten Weltkrieges untersuchte Peter Medawar das System der zellulären Immunität genauer, da man hoffte, bei Bombenopfern mit schweren Brandverletzungen Hauttransplantationen durchführen zu können. Das Hauptproblem solcher Transplantationen stellt die rasche Abstoßung der Transplantate dar[5].

Medawar stellte fest, dass Haut, die einer Maus entnommen wurde und dieser Maus an einer anderen Stelle transplantiert wurde (sogenannte autogene Transplantation), an dieser Stelle anwuchs, während Haut, die einer anderen Maus (sogenannte allogene Transplantation) transplantiert wurde, bald darauf abgestoßen wurde. Dies geschah aber nicht, wenn die Mäuse sehr nah verwandt waren, wie dies bei Inzuchtstämmen der Fall ist (sogenannte syngene Transplantation). Man entdeckte aufgrund dieser Erkenntnisse die Moleküle, welche für das Abstoßen der Haut verantwortlich sind, und

nannte sie Haupthistokompatibilitätsantigene (major histocompatibility complex, MHC). Im Verlauf weiterer Studien entdeckte man die zentrale Rolle dieser Moleküle bei der Infektabwehr. Diese Moleküle sind in der Lage, Peptide zu binden[6,7,8], je nach Typ des MHC-Moleküls entweder aus dem Zytosol (MHC-Klasse I) oder aus Endosomen (MHC-Klasse II).

Die Komplexe von Peptid und MHC-Molekül werden an der Zelloberfläche präsentiert. T-Zellen können an diese Komplexe binden. Diese Bindung ist notwendig für die Aktivierung und die Proliferation dieser Zellen, aber nicht ausreichend[9].

Es wurde klar, dass jeder T-Zellrezeptor eine andere Kombination von Peptid und MHC Molekül erkennt[10]. Diese Vorgänge entstehen durch Rekombination verschiedener Gensequenzen des T-Zellrezeptors, ein Vorgang, der in vielem der Rekombination von Gensequenzen der antikörperproduzierenden B-Zellen ähnelt.

Da die T-Zellen somit spezifisch mit ihrem T-Zellrezeptor an Peptide binden, die an Strukturen des angeborenen Immunsystems gebunden sind, kann man diese Synapsen als eine zentrale Verknüpfung des „angeborenen“ mit dem „adaptiven“ Immunsystems ansehen. In Übereinstimmung mit dieser Sichtweise nehmen die $CD4^+$ -T-Lymphozyten (im Folgenden kurz $CD4^+$ -T-Zellen genannt) eine zentrale Rolle gerade bei der Vermittlung zwischen den beiden Teilen des Immunsystems und bei der Entstehung von Immunität insgesamt ein.

1.2 MHC-Moleküle und deren Aufgabe

Um diese wichtige Synapse des Immunsystems darzustellen, wird der Aufbau der MHC-Moleküle kurz beschrieben.

Die MHC-Moleküle bestehen aus einer kurzen intrazellulären, einer Transmembran- und einer Extrazellulärdomäne. Die Extrazellulärdomäne bildet eine Grube, in welche sich Peptide lagern können. Allerdings lagert nicht jedes Peptid in jeder Bindungsgrube, sondern Peptide mit bestimmten Aminosäuren an bestimmten Positionen (sogenannte Ankerpositionen) haben eine höhere Affinität zu den MHC-Molekülen und werden somit bevorzugt präsentiert (siehe Abbildung 1).

Da jedoch nur etwa zwei Positionen sogenannte Ankerpositionen sind[6,7,8], die Peptide aber bis zu 10 Aminosäuren bei MHC-I Molekülen und bis zu 15 Aminosäuren bei MHC-II lang sein können, werden sehr viele verschiedene Peptide präsentiert (bei

einer Länge der Peptide von 12 Aminosäuren ergäben sich $20^8=10^{13}$ theoretisch mögliche Peptide, wenn zwei Positionen als Ankerpositionen konserviert sind).

Es gibt zwei Klassen von MHC Molekülen. MHC-I Moleküle werden im wesentlichen von jeder kernhaltiger Körperzelle exprimiert. Nach der Translation der mRNA wird das Protein im Zytosol mit endogenen Peptiden beladen und an der Oberfläche präsentiert. Peptide aus dem Zytoplasma der Zelle gelangen so an die Zelloberfläche. Befinden sich Peptide in der Zelle, die beispielsweise viralen Ursprungs sind, können diese von $CD8^+$ -T-Lymphozyten (im Folgenden kurz $CD8^+$ -T-Zellen genannt) erkannt und die Zelle zerstört werden. Somit ist die Präsentation von Peptiden auf MHC-I-Molekülen für die Bekämpfung von intrazellulären Infektionen oder neoplastischen Zellen essentiell. Außerdem können MHC-I Moleküle über sogenannte Kreuzpräsentation beladen werden[11,12]. Dieser Weg kommt beispielsweise bei dendritischen Zellen oder Makrophagen vor, die auf diesem Weg naive $CD8^+$ T-Zellen aktivieren können. MHC-II Moleküle werden normalerweise ausschließlich auf spezialisierten Zellen exprimiert. Diese Zellen werden antigenpräsentierende Zellen genannt. Nach der Translation der mRNA werden die MHC-II Moleküle in die Endosomen transportiert, wo sie mit Peptiden beladen werden, die durch Verdauung von extrazellulär aufgenommenen Proteinen entstehen. Somit kommen von Bakterien oder anderen Mikroorganismen, die von den antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert wurden, Peptide an die Oberfläche. Diese können von $CD4^+$ T-Zellen erkannt werden, wodurch diese dann wiederum eine starke Immunantwort fördern. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine Immunantwort auch über solche $CD4^+$ T-Zellen gehemmt werden kann[13,14]. $CD4^+$ T-Zellen stellen dadurch eine Schlüsselrolle der Immunantwort dar. Sie aktivieren B-Zellen und Makrophagen, die auf diese Weise extrazelluläre Infektionen bekämpfen oder über Kreuzpräsentation, wie oben erwähnt, $CD8^+$ T-Zellen aktivieren können.

Die MHC Klasse 1 Moleküle besitzen eine Bindungsstelle für CD8 und die MHC Klasse 2 Moleküle eine Bindungsstelle für CD4 Oberflächenantigene. Da die Bindung von CD4 oder CD8 an den entsprechenden MHC-Komplex essentiell für die Aktivierung der T-Zellen durch den T-Zellrezeptor ist, werden $CD4^+$ Zellen durch MHC-II Moleküle, $CD8^+$ Zellen aber durch MHC-I Moleküle aktiviert.

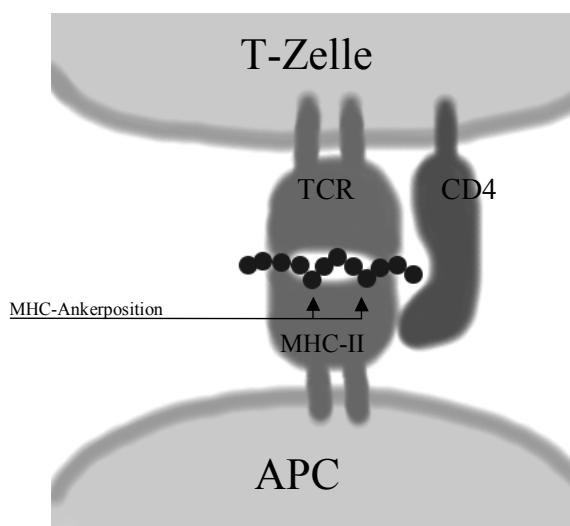


Abbildung 1 Schema der Bindung eines Peptides an MHC-II-Molekül und einen T-Zellrezeptor einer $CD4^+$ T-Zelle. Dargestellt ist das MHC-II-Molekül der antigenpräsentierenden Zelle (APC), an die das Peptid an bestimmten Ankerpositionen in der Bindungsgrube des Moleküls gebunden ist. Auf der anderen Seite geht das Peptid auch Bindungen mit dem T-Zellrezeptor (TCR) der T-Zelle ein. Die Bindung wird noch verstärkt, da ein CD4-Molekül der T-Zelle an das MHC-II-Molekül bindet. Zur Vereinfachung sind andere kostimulatorische Moleküle weggelassen. In der Realität geht das MHC-Molekül auch eine direkte Verbindung mit dem T-Zellrezeptor ein.

1.3 Die Reifung der T-Zellen

Auf der Seite des adaptiven Immunsystems muss ein funktionsfähiger T-Zellrezeptor auf den T-Zellen exprimiert werden, damit Peptide auf den MHC-Molekülen erkannt werden können.

Die Ursprungszellen der T-Zellen liegen im Knochenmark. Aus diesen differenzieren sich unreife Thymozyten, die zu diesem Zeitpunkt negativ für die Expression von T-Zellrezeptor, CD4 oder CD8 sind. Diese Zellen wandern in den Thymus ein. Dort werden die verschiedenen Abschnitte des Genoms, die für den T-Zellrezeptor kodieren, neu kombiniert. Diesen Vorgang nennt man „Rearrangement“.

Der T-Zellrezeptor der $\alpha\beta$ -T-Zellen besteht aus einer α - und einer β -Kette. Die Gene der α -Kette besteht aus 3 Regionen (der V, J und der C Region), die Gene β -Ketten noch zusätzlich aus D Regionen. Jede dieser Regionen ist nicht nur einmal kodiert, sondern die Regionen sind hintereinander mit Abweichungen bis zu 75 mal (V_α Gene bei der Maus) wiederholt kodiert. Bevor eine T-Zelle reifen kann, wird eine zufällige V-Kette mit jeweils einer anderen, zufällig ausgewählten J, D und C Kette verknüpft. Aufgrund der zufälligen Koppelung der Gene („Rearrangement“) entsteht auf jeder T-Zelle ein anderer T-Zellrezeptor. Während dieses Rearrangements, welches von den Produkten

der „rearrangement activating genes“ (RAG) abhängt, wird zuerst eine β -Kette des T-Zellrezeptors exprimiert und an der Oberfläche präsentiert[15,16,17]. Werden funktionale β -Ketten an der Zelloberfläche in Verbindung mit CD3 präsentiert, wird das Rearrangement des anderen Alleles eingestellt. Dieser Vorgang wird allele Exklusion genannt und verhindert das Entstehen zweier funktionaler T-Zellrezeptoren auf einer T-Zelle.

Diese Expression ist notwendig für die nun folgende Expression von CD4 und CD8 an der Oberfläche. Bei diesen doppeltpositiven T-Zellen folgt das Rearrangement der α -Kette und damit die Expression eines kompletten $\alpha\beta$ T-Zellrezeptors.

Bindet der exprimierte T-Zellrezeptor an MHC-I Moleküle, wird nun ausschließlich CD8 exprimiert[18], umgekehrt wird nur CD4 exprimiert, wenn MHC-II Moleküle gebunden werden[19,20,21].

Ist der exprimierte T-Zellrezeptor unfähig, an MHC-Moleküle zu binden, stirbt die T-Zelle durch Apoptose ab.

Auf den Thymusepithelzellen werden Selbstpeptide an MHC-Moleküle gebunden präsentiert. Außerdem wandern antigenpräsentierende Zellen aus der Peripherie in den Thymus ein und präsentieren Selbstpeptide aus der Peripherie. Binden T-Zellen mit sehr hoher Affinität an solche Komplexe, sterben auch diese durch Apoptose ab. Diese beiden Vorgänge, negative Selektion genannt, scheint über verschiedene Wege vermittelt zu werden, so über CD30[22], CD40-CD40L und auch teilweise über CD95[23,24].

Nur bei T-Zellen, deren T-Zellrezeptor mit mittlerer Affinität an die MHC-Moleküle der Thymusepithelien bindet, findet keine Apoptose statt. Dies nennt man positive Selektion.

Nach der Reifung im Thymus gelangen die T-Zellen in den Blutkreislauf und in die sekundären Lymphorgane wie Lymphknoten, Milz und Leber. Dort kommen sie mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) in Kontakt, die auf ihren MHC-Molekülen Peptide von Proteinen präsentieren, die von den APC bei ihrer Wanderung durch das nichtlymphatische Gewebe aufgenommen wurde.

T-Zellen aus dem Thymus, die von APC aktiviert werden, werden zu sogenannten Effektorzellen. Sie wandern jetzt aus den Lymphknoten in die Peripherie, wo $CD8^+$ Zellen in der Lage sind, Zellen, die das entsprechende Peptid auf ihrer Oberfläche präsentieren, zu töten.

Allerdings sterben T-Zellen auch in der Peripherie ab, wenn sie zu stark aktiviert werden. Dieser sehr wichtige, aktivierungsinduzierter Zelltod genannte Prozess, ist abhängig von der Expression des Apoptosemoleküls CD95 (Fas) auf der Oberfläche der T-Zellen. Die Relevanz der negativen Selektion erkennt man bei Mäusen, bei denen das Gen für CD95 ausgeschaltet ist[25]. Diese Mäuse entwickeln schwere, dem Lupus erythematodes ähnliche Autoimmunkrankheiten.

Die Rolle der CD4⁺ Zellen liegt darin, mithilfe von Zytokinen oder durch direkten Kontakt von Oberflächenmoleküle andere Zellen des Immunsystems zu aktivieren. B-Zellen werden zur Produktion von Antikörpern angeregt, und Makrophagen können beispielsweise nach Aktivierung durch CD4⁺ T-Zellen intrazelluläre Mykobakterien abtöten.

Aus aktivierten T-Zellen können Gedächtniszellen entstehen, die durch ihre lange Lebensdauer und durch ihre erhöhte Reaktivität eine wichtige Rolle bei der Abwehr erneut auftretender Infektionen spielen. Vieles über deren Entstehen ist allerdings noch unklar, und bis vor wenigen Jahren wurde sogar vermutet, dass T-Zellgedächtnis nur entsteht, da spezifische T-Zellen in höherer Frequenz vorkommen und dass dieser Effekt von der stetigen Reaktivierung der T-Zellen, also von persistierenden Infektionen, abhängt[26] . Es gelang aber, CD4⁺-Gedächtniszellen nach Zelltransfer in MHC-II-Klasse defizienten Mäusen nachzuweisen, wo eine Reaktivierung der T-Zellen unmöglich sein sollte[27,28]. Somit scheinen T-Gedächtniszellen *in vivo* vorzukommen.

1.4 Autoimmunkrankheiten

Ohne das Immunsystem ist komplexeres Leben nicht vorstellbar. Doch obwohl es bei den meisten Individuen zu einer kompetenten Abwehr von gefährlichen Organismen kommt, und körpereigene Strukturen nicht nachhaltig durch die Immunreaktionen beeinträchtigt werden, gibt es Krankheiten, bei denen alles darauf hindeutet, dass sie durch eine fehlgeleitete Immunantwort hervorgerufen sind.

Eine Unterteilung der Autoimmunkrankheiten kann in organspezifisch und systemisch manifestierte Krankheiten erfolgen.

Unter systemischen Autoimmunkrankheiten versteht man Krankheiten, die sich nicht nur an einzelnen Organen manifestieren, sondern vielfältige Schädigungen des gesamten Organismus hervorrufen. Typisch für diese Gruppe ist der systemische Lupus erythematodes (SLE). Diese Krankheit wird dementsprechend nicht durch ein einzelnes

Symptom oder eine spezifische Pathologie diagnostiziert, sondern es müssen verschiedene Befunde vorhanden sein. Typisch für systemischen Lupus erythematodes sind die Antikörper gegen doppelsträngige DNS, die aber nicht bei allen Patienten auftreten. Dementsprechend ist umstritten, inwieweit diese Antikörper ätiologisch für SLE verantwortlich sind oder inwieweit sie nur ein Epiphänomen darstellen.

Auf der anderen Seite stehen die organspezifischen Autoimmunkrankheiten. Zu diesen werden Diabetes mellitus Typ 1, rheumatoide Arthritis oder multiple Sklerose gezählt. Bei all diesen Krankheiten ist hauptsächlich ein Organ betroffen, und es lassen sich bei zumindest einigen dieser Pathologien organspezifische Abwehrreaktionen wie spezifische Antikörper oder autoreaktive T-Zellen finden.

1.5 Hypothesen zum Entstehen von Autoimmunität

Da bisher spezifische Erreger innerhalb der Läsionen der obengenannten Krankheiten nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten, wird als Ursache ein autoreaktiver Prozess diskutiert. Ein sehr wesentlicher Faktor, welcher auf die Schlüsselrolle von Lymphozyten bei Autoimmunkrankheiten hindeutet, sind Transferexperimente, bei welchen aktivierte selbstreaktive $CD4^+$ Zellen von einem erkranktem Tier auf ein gesundes Tier[29,30,31,32] oder sogar von einem erkranktem Menschen auf eine immundefiziente Maus[33] übertragen werden. Ein solcher Transfer reicht bei vielen Tiermodellen aus, um Autoimmunkrankheiten hervorzurufen.

Unklar ist, was T-Zellen, die im Thymus nicht der negativen Selektion zum Opfer gefallen sind, in der Peripherie zu aktivierten, autoreaktiven T-Zellen macht.

Im folgenden werden verschiedene Hypothesen dargestellt, die versuchen, dies zu erklären.

1.5.1 Autoantigen wird im Thymus nicht präsentiert

Eine Erklärung für das Vorkommen von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie könnte sein, dass das Peptid, gegen welches die T-Zellen reagieren, überhaupt nicht oder in einer anderen Form im Thymus präsentiert wird. Plausibel erscheint diese Hypothese besonders bei Proteinen, die nur in bestimmten Organen produziert werden, wie dies beispielsweise bei Insulin oder Proteinen des ZNS der Fall ist, oder bei Proteinen, die erst später in der Entwicklung des Individuums, etwa in der Pubertät, exprimiert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass medulläre Thymusepithelien auch Proteine exprimieren, die sonst nur in speziellen Organen vorkommen[34]. Durch diese

„promiske Expression“ würde somit also auch eine negative Selektion bei T-Zellen stattfinden, die solche Proteine erkennen.

Interessanterweise gibt es bei manchen Menschen einen Gendefekt im sogenannten AIRE-Protein[35,36]. Dieser Defekt führt zur autoimmunen Polyendokrinopathie Typ I. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Defekt zu einer verminderten promisklen Expression im Thymus führt[37].

Allerdings können auch ohne diesen Defekt Peptide im Thymus in einer anderen Form präsentiert werden als später in der Peripherie. Ein Beispiel hierfür ist das Myelin-basische Protein (MBP). Dieses Protein, das für die Umscheidung der Axone von Gliazellen im zentralen und peripheren Nervensystem (ZNS) exprimiert wird, scheint zusammen mit anderen Proteinen des ZNS eine wichtige Rolle bei der multiplen Sklerose zu spielen.

Das Gen dieses Proteins besteht aus mehreren Exons. Im ZNS von den Oligodendrozyten unter anderem ein an N-terminaler Position azetyliertes MBP-Protein präsentiert. Im Thymus werden jedoch andere Exons transkribiert[38,39]. Bei der multiplen Sklerose wird das MBP-Protein erkannt[40,41].

Als Tiermodell für die multiple Sklerose gilt EAE (siehe unten), und in vielen dieser Tiermodelle erkennt ein Großteil der autoreaktiven T-Zellen ein Peptid bestehend aus den ersten N-terminalen 9 bis 11 Aminosäuren. Interessant ist, dass diese Peptide nur erkannt werden, wenn sie, genau wie im ZNS, in azetylierter Form präsentiert werden. Es ist vorstellbar, dass die Deletion im Thymus in diesem Fall versagt, weil die Expression des Proteins im Thymus eine andere ist als im ZNS.

1.5.2 Zusammenbruch immunologischer Schranken

Bestimmte Körperregionen sind für das Immunsystem nur eingeschränkt erreichbar, da diese Gewebe durch biologische Schranken abgeschirmt sind. Zu diesen Regionen gehören zum Beispiel das ZNS, das Auge oder die Testes.

Das physiologische Korrelat dieser Schranken sind einmal das Vorhandensein von tight-junctions[42], was unaktivierte Lymphozyten nicht in diese Regionen einwandern lässt. Erst wenn Lymphozyten in der Peripherie aktiviert werden, exprimieren sie Oberflächenmoleküle, mit deren Hilfe sie in die Gewebe eindringen können[43,44].

Zum anderen werden immunsupprimierende Zytokinen oder Oberflächenmoleküle, wie zum Beispiel TGF- β 2 oder FasL[45,46], in diesen Geweben exprimiert, die eine Inflammation hemmen.

Proteine, die ausschließlich innerhalb solcher Organe produziert werden, werden Zellen des Immunsystems unter physiologischen Bedingungen nicht präsentiert.

Autoimmunität könnte aber entstehen, wenn die Schranken dieser Systeme zusammenbrechen. Ein deutlicher Hinweis auf die Relevanz der immunologischen Schranken ist das Vorkommen der sympathischen Ophthalmie. Diese Krankheit entsteht, wenn ein Auge durch Trauma verletzt ist und es zu einer immunologischen Reaktion gegen Antigene dieses Auges kommt. Aufgrund dieser immunologischen Reaktion kann es nun zu einer Zerstörung des gesunden Auges kommen, da aktivierte T-Zellen in das Auge einwandern und auch hier gegen die Antigene reagieren.

Ein Durchbrechen der Schranken könnte außerdem bei Infektionen vorkommen, da in diesem Fall die immunstimulatorischen Signale innerhalb dieses Organs immunsupprimierenden Signale, also die immunologische Schranke, überwiegen.

Die Tatsache, dass immunologische Schranken durch Infektionen durchbrochen werden können, konnte in Tiermodellen gezeigt werden[47,48].

Außerdem kann es zwar nach traumatischen oder inflammatorischen Ereignissen zu akuten Demyelinisierungen kommen, ein Zusammenhang zwischen Multipler Sklerose und Enzephalitiden wurde aber bisher noch nicht beschrieben. Vielmehr wird sogar eine Neuroprotektion durch ein vorangegangenes Trauma diskutiert[49,50,51].

Da nach neueren Studien enzephalitogene T-Zellen auch im Blut gesunder Individuum[52,53,54] und sogar im ZNS gesunder Mäuse[55] vorkommen, würde man bei einem Zusammenbrechen der immunologischen Schranken aber eher ein Entstehen von Autoimmunität vermuten. Dies wird aber nicht beobachtet, also können die immunologischen Schranken nicht alleine für die Verhinderung von Autoimmunität verantwortlich sein.

1.5.3 Expression zweier T-Zellrezeptoren auf einer T-Zelle

Obwohl nach der oben beschriebenen Reifung der Zellen im Thymus jede T-Zelle ausschließlich einen T-Zellrezeptor exprimieren sollte, wurde beobachtet, dass in der Peripherie auch T-Zellen mit zwei unterschiedlichen T-Zellrezeptoren vorkommen[56,57]. Dies wird auf die nicht vollständige allele Exklusion der TCR α -

Kette zurückgeführt, so dass die exprimierte β -Kette mit zwei unterschiedlichen α -Ketten verbunden werden kann und so zwei T-Zellrezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten exprimiert werden.

Es ist vorstellbar, dass durch solche T-Zellen Autoimmunität entsteht, wenn T-Zellen über einen ihrer T-Zellrezeptoren durch Fremdanigene aktiviert werden. Besitzt der zweite T-Zellrezeptor Autoantigene, würde die T-Zelle auch gegen diese körpereigenen Strukturen reagieren und so Autoimmunität hervorrufen können. In einem transgenen Mausmodell konnte diese Hypothese bestätigt werden[58].

1.5.4 Autoimmunität durch antigenunabhängige T-Zellaktivierung

Die oben erwähnten Hypothesen zur Entstehung von Autoimmunität haben gemein, dass zwar Mechanismen der zellulären Immunität versagen, dass aber die einzelnen T-Zellen spezifisch über die T-Zellrezeptoren aktiviert wird. Die Hypothesen, die aber in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollen, also die Hypothese der „Molekularen Mimikry“ und die Hypothese der „Bystander-Aktivierung“ beinhalten, dass die T-Zellen nicht so spezifisch sind wie früher angenommen, dass also mehrere Peptide („Molekulare Mimikry“) bzw. ein gänzlich antigenunabhängiger Mechanismus („Bystander-Aktivierung“) zu einer Aktivierung von T-Zellen und somit eventuell zu Autoimmunität führen kann.

Wie oben beschrieben wurde, stellen die spezifisch bindenden T-Zellrezeptoren und die darauf folgende T-Zellaktivierung eine Schlüsselrolle im Funktionsgefüge des Immunsystems dar.

Eine antigenunabhängige Aktivierung der T-Zellen sollte die Unterscheidung von „Fremd“ und „Selbst“ stark erschweren, wenn nicht ganz und gar unmöglich machen. Trotzdem wurden in den letzten Jahren immer mehr Untersuchungen veröffentlicht, in denen antigenunabhängige Aktivierungen von T-Zellen beschrieben wurden[59,60,61,62,63]. Eine weitere Untersuchung dieser Phänomene scheint wichtig, gerade weil die Spezifität der T-Zellen wesentlich für das bisherige Verständnis des Funktionierens des Immunsystems war.

Im Grunde genommen gibt es drei mögliche Szenarien, welche Rolle antigenunabhängige Aktivierung von T-Zellen bei der Induktion von Autoimmunität spielt:

-
- Antigenunabhängige Aktivierungen kommen unter physiologischen Bedingungen nicht vor, somit spielen diese Hypothesen keine Rolle.
 - Antigenunabhängige Aktivierungen kommen relativ selten vor, somit kann es unter ungünstigen Umständen auf einem solchen Wege zu Autoimmunität kommen.
 - Antigenunabhängige Aktivierungen kommen häufig vor, es muss also Mechanismen geben, welche Autoimmunität auf einem solchen Wege wirksam verhindern.

Wesentlich scheint also die Häufigkeit des Vorkommens von antigenunabhängigen Aktivierungen von T-Zellen zu sein. Um diese zu untersuchen, müssen die Phänomene möglichst unter physiologischen Bedingungen untersucht werden.

In dieser Arbeit sollen verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden, durch die die Häufigkeit solcher antigenunabhängigen Bindungen in einem gewissen Rahmen abgeschätzt werden können und somit Aussagen über die physiologische Relevanz gemacht werden sollen.

Im folgenden sollen die beiden in dieser Arbeit genauer untersuchten Hypothesen für antigenunabhängige Aktivierungen von T-Zellen beschrieben werden.

1.5.4.1 Molekulare Mimikry

Für lange Zeit wurde angenommen, jeder T-Zellrezeptor sei spezifisch für genau eine Peptidsequenz. Durch die Selektion der T-Zellen im Thymus (siehe Seite 12) sollten nur T-Zellen in die Peripherie gelangen, die mit den körpereigenen MHC-Molekülen reagieren, wenn diese ein Fremdpeptid gebunden haben. Dann würden die T-Zellen proliferieren und sich somit T-Zellen anreichern, die gegen Peptide von Fremdorganismen als sogenannte Gedächtniszellen reagieren können.

Allerdings stellte man fest, dass ein T-Zellrezeptor nicht nur mit einem Peptid, sondern mit verschiedenen Peptiden reagiert, dass sogar T-Zellen durch Fremdpeptide aktiviert werden und anschließend gegen Selbstpeptide reagieren können[59,60,61,64]. Sind T-Zellen auf eine solche Weise aktiviert, sollten sie gegen Selbstantigene reagieren und Autoimmunität hervorrufen.

Dieses Phänomen wird als „Molekulare Mimikry“ bezeichnet (siehe Abbildung 2), da man sich zuerst vorstellte, dass Bakterien durch körperähnliche Proteine eine „Tarnung“ erreichen könnten. Später wurde der Begriff aber eher entgegengesetzt wie oben beschrieben eingesetzt, also für das Erkennen von körpereigenen Strukturen durch das Immunsystems aufgrund von körperähnlichen, mikrobiellen Proteinen.

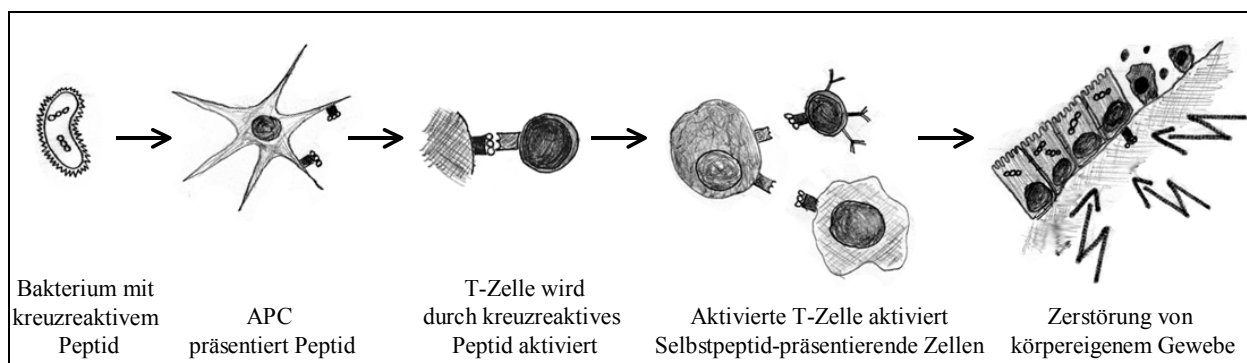


Abbildung 2: Hypothese der molekularen Mimikry. Ein Fremdorganismus, hier beispielsweise ein Bakterium, enthält ein kreuzreaktives Peptid. Das Bakterium wird von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und prozessiert, das kreuzreaktive Peptid wird präsentiert. T-Zellen werden durch dieses Peptid aktiviert. In der Peripherie würden sie auch Immunzellen aktivieren, die ein kreuzreaktives Selbstpeptid präsentieren. Es kommt dann zu einer Zerstörung von körpereigenem Gewebe, also zu Autoimmunität.

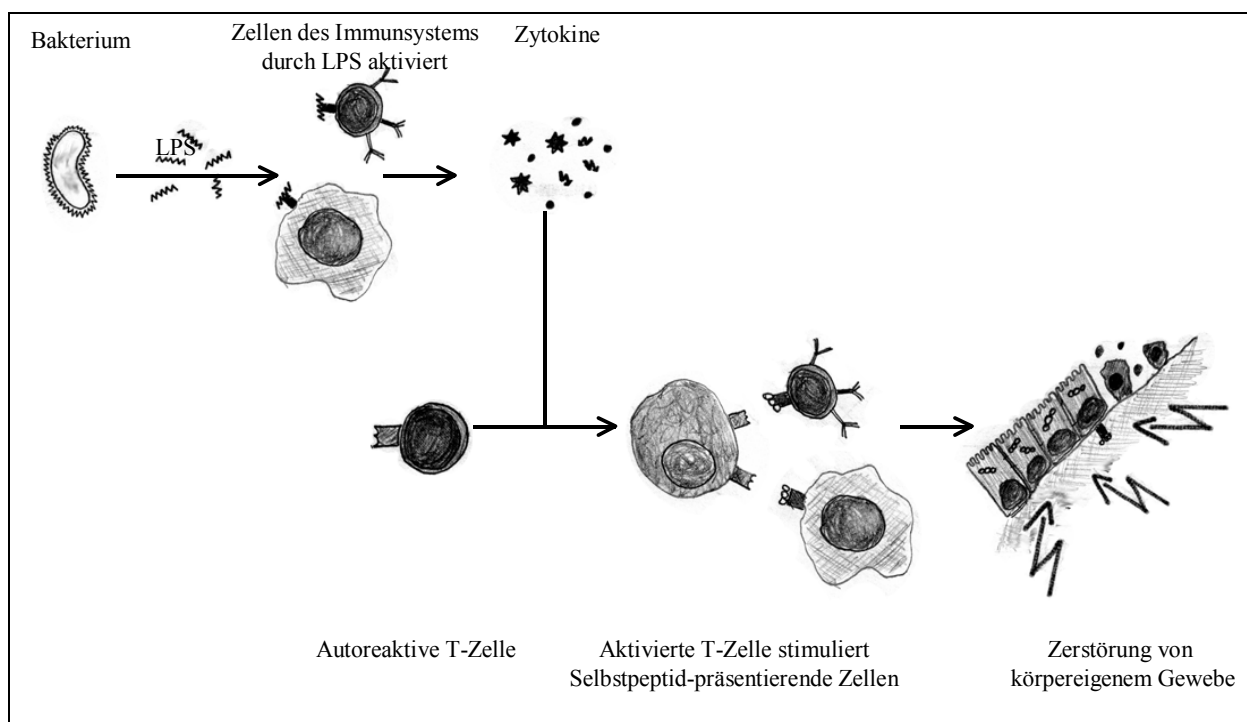


Abbildung 3: Hypothese der „Bystander-Aktivierung“. LPS-enthaltende Bakterien infizieren einen Organismus. Durch das LPS werden Zellen des Immunsystems wie Makrophagen oder B-Zellen unspezifisch aktiviert und produzieren Zytokine. Durch diese Zytokine werden nach der Hypothese der „Bystander-Aktivierung“ T-Zellen aktiviert. Unter diesen T-Zellen sind nun auch autoreaktive T-Zellen, die Zellen des Immunsystems aktivieren, wenn diese das Selbstpeptid präsentieren. Es kommt dann zu einer Zerstörung von körpereigenem Gewebe, also zu Autoimmunität.

Von direktem klinischen Interesse wurden solche Überlegungen unter anderem, als nach einigen Fällen von Hepatitis B-Vakzinierungen demyelinisierenden Erkrankungen auftraten[65,66]. Es wurde die Vermutung geäußert, dass der Impfstoff kreuzreaktive Peptide enthielte und auf diese Weise autoimmune Erkrankungen wie multiple Sklerose

hervorriefe[67]. Auch wenn klinische Untersuchungen diesen Verdacht nicht erhärten konnten[68,69,70], zeigt dieser Verdacht wie auch die grundlegende Relevanz für das Verständnis des Immunsystems den Grund für eine detaillierte Untersuchung dieser Phänomene.

1.5.4.2 Indirekte Aktivierung von T-Zellen durch Zytokine (*Bystander activation*)

Als zweite Ursache einer antigenunabhängigen Aktivierung wird die „Bystander-Aktivierung“ beschrieben.

Wichtig für die Aktivierung von T-Zellen ist die Bindung des T-Zellrezeptors an Peptide, welche vom MHC Molekül präsentiert werden. Dies allein reicht jedoch nicht aus, da auch kostimulatorische Moleküle, beispielsweise CD80 oder CD86, an der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen notwendig sind, um eine Aktivierung der T-Zellen hervorzurufen. Die Expression von kostimulatorischen Molekülen oder inflammatorischen Zytokinen kann durch mikrobielle Substanzen wie LPS oder CpG-reiche DNA Bruchstücke verstärkt werden[71,72,73].

Wird eine T-Zelle über ihren T-Zellrezeptor und die notwendigen kostimulatorischen Signale aktiviert, ist dies eine spezifische Aktivierung.

Jedoch werden während einer Immunreaktion vielfältige Zytokine und andere immunstimulatorische Signale ausgeschüttet, die eventuell auch autoreaktive T-Zellen aktivieren könnten, die entweder überhaupt nicht über ihren T-Zellrezeptor Signale erhalten, oder während einer starken Immunantwort gegen infektiöse Erreger zufällig ein harmloses Selbstantigen erkennen. Da die Kostimulation durch die Infektion getriggert wurde, können solche T-Zellen suffizient aktiviert werden.

Eine solche Aktivierung wird „Bystander-Aktivierung“ genannt (siehe Abbildung 3).

1.6 Experimentell autoimmune Enzephalomyelitis

Bei der Erforschung des Immunsystems ist die Wahl eines geeigneten Tiermodells von großer Wichtigkeit. Gut wurden die Tiermodelle der experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) charakterisiert. Mit dem Einsatz von Tieren, die transgen für einen enzephalitogenen T-Zellrezeptor und somit suszeptibel für EAE sind, sind diese Modelle ideal zur Untersuchung für das Entstehen von Autoimmunkrankheiten: Da das T-Zellrepertoire stark eingeschränkt ist, lassen sich Substanzen leicht *in vitro* auf die Induktion von T-Zellproliferation und die *in vitro* beobachteten Effekte können auf die

Relevanz *in vivo* überprüft werden, indem die Fähigkeit der Substanzen, EAE zu induzieren, überprüft wird.

1.6.1 Historische Entwicklung des Modells

Auf der Suche nach einem Impfstoff gegen Tollwut injizierte Pasteur gesunden Individuen lysiertes Rückenmark und Gehirn von an Tollwut erkrankten Tieren. Einige der Individuen erkrankten aber an einer fortschreitenden Lähmung, die er postvakzinelle Enzephalomyelitis nannte[1]. Es war nicht klar, ob dies ein Effekt des Virus oder der Gehirnsubstanz war.

1933 konnte Rivers dieselben Symptome in Rhesusaffen erzeugen[74], denen er wiederholt lysierte Hirnschubstanz von Kaninchen subkutan spritzte. Da die Kaninchen nicht an Tollwut erkrankt waren, schloss man, dass dies ein Effekt der Hirnschubstanz auf den Organismus der Rhesusaffen sein muss. Er stellte fest, dass das pathologische Korrelat der Symptome entzündliche Infiltrate im zentralen Nervensystem der Affen darstellen.

Wenn die Hirnschubstanz vor der Applikation in kompletten Freudschen Adjuvant emulgiert und den Affen danach Pertussis Toxin intravenös appliziert wurde[75], reichte eine Injektion zur Induktion von EAE aus.

Auch bei anderen Tierarten konnte die Krankheit induziert werden[76,77]. Selbst durch arteigenes Hirngewebe kann die Krankheit hervorgerufen werden[77].

Da ein autoimmunes Geschehen angenommen wurde, wurde die Krankheit „experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis“ (EAE) genannt.

1960 stellte Paterson fest, dass die Krankheit in Ratten von einem Tier zum anderen übertragen werden kann, wenn man Lymphozyten des kranken Tiers dem gesunden Tier appliziert[29]. Später wurde klar, dass $CD4^+$ T-Zellen des kranken Tiers ausreichen, um die Krankheit zu übertragen[31,78,79]. Da man auch in den entzündlichen Infiltraten $CD4^+$ Zellen vorfindet[80] und man durch Depletion der $CD4^+$ Zellen mit Antikörpern EAE in Tieren behandeln kann[81,82], wird eine zentrale Rolle dieses Zelltyps angenommen.

Allerdings reichen naive autoreaktive $CD4$ -Zellen nicht aus, um EAE auszulösen. Die Zellen müssen vorher aktiviert worden sein[83].

Aufgrund gewisser Ähnlichkeiten zur chronischen disseminierten Enzephalomyelitis beziehungsweise der multiplen Sklerose, besonders den entzündlichen Infiltraten und den Lähmungserscheinungen, gilt EAE als Tiermodell für diese Erkrankung.

Insbesondere bei neueren Studien, bei denen ein humanisiertes Mausmodell (die Mäuse sind transgen für die Gene für humanes HLA-DR2, humanes CD4 und einen T-Zellrezeptor, der spezifisch für das Peptid MBP₈₄₋₁₀₂ ist) verwendet wird, zeigen sich sehr viele Gemeinsamkeiten mit multipler Sklerose[84]. Bei diesem Modell kommt es nach Immunisierung mit MBP₈₄₋₁₀₂ zu einem remittierenden Verlauf, zu Demyelinisierungen und auch zu Ausfällen im Kleinhirn, welche bei anderen EAE-Modellen nicht beobachtet werden.

Trotz dieser Ähnlichkeiten der EAE zu MS ist es eher gerechtfertigt, EAE als ein Tiermodell für die akute disseminierte Enzephalomyelitis beim Menschen zu benutzen. Diese Erkrankung ist beim Menschen der MS, also der chronischen disseminierten Enzephalomyelitis, sehr ähnlich und die Differentialdiagnose beim Menschen entsprechend schwierig. Jedoch tritt die akute disseminierte Enzephalomyelitis nach Infektionen oder Vakzinierungen auf, eine entscheidende Ähnlichkeit zu EAE. Wahrscheinlich handelt es sich bei der von Pasteur entdeckten postvakzinellen Enzephalomyelitis auch um eine Sonderform der akuten demyelinisierenden Enzephalomyelitis. Inwieweit therapeutische Regimes, die für akute demyelinisierende Enzephalomyelitis entwickelt werden, auch für MS wirken, ist unklar. Da aber bisher kein alternatives Tiermodell zur Untersuchung der MS entwickelt wurde, muss auch weiterhin dieses Tiermodell verwendet werden.

Jedoch sind eventuelle Unterschiede zwischen der Autoimmunkrankheit MS und EAE für diese Arbeit, in welcher der Einfluss von Kreuzreaktivität und „Bystander-Aktivierung“ bei der Entstehung von Autoimmunität untersucht werden soll, nicht sehr wesentlich. Wie oben erwähnt, wurde die Krankheit EAE am Menschen entdeckt. Damit stellt das Tiermodell der EAE ein immunologisches Geschehen dar, welches auch beim Menschen vorkommen kann.

Somit können mit einiger Vorsicht Erkenntnisse über EAE auch für das humane Immunsystem gelten.

1.6.2 Charakteristika des Modells

Wie oben bereits erwähnt, stellen die entzündlichen Infiltrate im zentralen Nervensystem im Zusammenhang mit peripheren Lähmungen den pathognomonischen Befund der EAE dar. Die klinischen Verläufe wie auch die Histologien können allerdings in verschiedenen Modellen von EAE stark variieren.

In dieser Arbeit beruht das Modell auf der Immunisierung von Mäusen mit dem MHC-Phänotyp I-A^u mit MBP, also beispielsweise den Mausstämmen PL/J oder B10.PL, mit Peptiden aus dem MBP-Protein. Die Verläufe nach einer solchen Immunisierung sind monophasisch[85]. Die Infiltrate von solchen an EAE erkrankten Mäusen im ZNS bestehen hauptsächlich aus perivaskulären Infiltraten inflammatorischer Zellen, wobei Demyelinisierungen nur sehr selten zu finden sind. Die zelluläre Zusammensetzung der Infiltrate ist nicht einheitlich, in unserem MBP-Modell besteht es hauptsächlich aus Makrophagen, einigen T-Zellen und B-Zellen (siehe Seite 69).

Im Gegensatz dazu kommt es bei manchen Mausstämmen mit dem MHC-Phänotyp I-A^s (SJL/J Mäuse), die mit PLP-Protein oder bestimmten Peptiden daraus immunisiert werden, zu schubweisen Verläufen mit vollständigen oder auch unvollständigen Remissionen. Die Histologien in diesen Modellen bestehen auch aus mononukleären, perivaskulären Infiltraten, zusätzlich aber auch aus Zonen akuter und chronischer Demyelinisierung und Fibrinablagerungen im Gehirn[86]. Der klinische Verlauf und die histologischen Befunde dieser Modelle ähneln also mehr der klassischen multiplen Sklerose als das von uns benutzte MBP-Modell.

Zusätzlich zu diesen zwei Modellen gibt es noch eine Vielzahl anderer, wie zum Beispiel auf myelinem Oligodendroglaprotein (MOG) oder auf myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) beruhende Modelle[87]. Auf diese soll aber nicht im Detail eingegangen werden.

1.6.3 Die Wirkung der Adjuvantien

Zur Induktion von EAE sind in unserem wie in vielen anderen Tiermodellen zwei Adjuvantien nötig: Komplettes Freund's Adjuvant und Pertussistoxin.

Die Verwendung beider Adjuvantien wurde empirisch schon in den vierziger Jahren entwickelt[88].

Inzwischen ist einiges über deren Wirkung bekannt: Komplettes Freund's Adjuvant wird vermutlich benötigt, um die Zellen des angeborenen Immunsystems, also besonders Makrophagen und dendritische Zellen, zu der Präsentation der Peptide in einem entzündlichen Milieu anzuregen. Dies ist sehr wichtig für die Entstehung von Immunreaktionen. Unterbleibt die Gabe von diesem Adjuvant, entsteht keine Autoimmunität, in manchen Modellen kommt es sogar zur Entwicklung von Anergie gegen das applizierte Antigen[89] oder zur Depletion der T-Zellen[90]. Dies wird darauf

zurückgeführt, dass Makrophagen und besonders Dendritische Zellen in inaktivem Zustand die T-Zellen anerg machen, die spezifisch an das mit Peptid beladene MHC-Molekül binden, das an ihrer Oberfläche präsentiert wird[91].

Die Rolle von Pertussistoxin bei der Induktion von EAE ist weniger klar. Pertussistoxin besitzt eine adjuvante Wirkung bei Immunisierungen. Diese adjuvante Wirkung wird auch bei Inaktivierung der toxischen Komponente beibehalten, ist also auch bei den bei der Impfung verwendeten DPT (Diphtherie-Pertussis-Tetanus) Impfstoffe noch wirksam. Die verstärkende Wirkung von Pertussistoxin bei der Induktion von EAE wurde von Lee und Olitsky 1955 festgestellt[75].

Pertussistoxin bei Induktion von EAE wird, im Gegensatz zum Kompletten Freundes Adjuvant, nicht lokal mit dem Antigen zusammen, sondern systemisch, nämlich intravenös, appliziert. In vielen Arbeiten[85,92,93] wird vermutet, dass Pertussistoxin die Blut-Hirn-Schranke für Zellen des Immunsystems, speziell für Lymphozyten, durchlässig macht. Dies wäre insofern wichtig, weil unter physiologischen Bedingungen diese Schranke undurchlässig für ruhende Lymphozyten ist (siehe 1.5.2) und deswegen selbst Zellen, die autoreaktiv gegen Proteine des ZNS sind, keine Autoimmunität hervorrufen könnten, da sie die Selbstantigene nicht erreichen würden.

In anderen Untersuchungen[83,94] wird jedoch darauf hingewiesen, dass Pertussistoxin auch eine direkte Wirkung auf Lymphozyten besitzt.

Ein direkter Effekt auf Lymphozyten könnte beispielsweise darin bestehen, dass das homing-Verhalten der Lymphozyten dahingehend verändert wird, dass sie vermehrt ins ZNS wandern[95,96].

1.6.4 Die Rolle der CD4⁺ T-Zellen

Dass T-Zellen kausal für das Entstehen von EAE verantwortlich sind, wurde gezeigt, indem man T-Zellen von an EAE erkrankten Tieren in gesunde Tiere transferierte[29]. Die Empfängertiere entwickelten daraufhin EAE.

Nachdem die wesentliche Rolle der CD4⁺ T-Zellen bei der Pathogenese der EAE entdeckt wurde, begann man mit der weiteren Charakterisierung der T-Zellen.

Dabei stellte man fest, dass enzephalitogene T-Zellen durch Proteine und Peptide, welche im ZNS exprimiert werden, aktiviert werden können[97,98].

T-Zellen, die reaktiv gegen ZNS Autoantigene sind, konnten auch nach Klonierung oder nach *in vitro* Stimulation EAE hervorrufen, während dies andere T-Zellen nicht konnten.

Dies deutet darauf hin, dass in der Tat Autoreaktivität von T-Zellen für das Entstehen von EAE verantwortlich ist.

Jedoch reicht Autoreaktivität nicht aus: Werden naive, autoreaktive T-Zellen in gesunde Empfängertiere transferiert, erkranken diese nicht[31]. Selbst T-Zellrezeptor-transgene Mäuse mit vielen autoreaktiven T-Zellen erkranken in manchen Modellen nicht, solange kein zusätzlicher Stimulus erfolgt[99]. T-Zellen müssen also aktiviert werden, bevor sie EAE hervorrufen können.

Außerdem wurde gezeigt, dass MBP-spezifische T-Zellen, also T-Zellen, die durch Proteine des ZNS aktiviert werden können, im ZNS von gesunden Mäusen[99] oder im Blut von Menschen ohne neurologische Symptome vorkommen[52,53].

Trotzdem scheint ein wesentliches Kriterium für das Entstehen von EAE und eventuell auch anderen Autoimmunkrankheiten die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen zu sein.

Wie und warum autoreaktive T-Zellen aktiviert werden und zu EAE führen, ist Gegenstand vieler Hypothesen und Thema dieser Arbeit. Einige Hypothesen wurden weiter oben erwähnt (s. S. 15 ff).

1.6.5 T-Zellrezeptor transgene Mäuse und EAE

Wesentlich für das Erkennen von „Fremd“ und „Selbst“ ist das Erkennen von Peptiden auf MHC-Molekülen durch den T-Zellrezeptor. Obwohl dieser Kontakt sehr wichtig ist, sowohl für physiologische Immunantworten als auch für das Entstehen von Autoimmunität, sind Untersuchungen daran nicht trivial, da praktisch jede T-Zelle einen individuellen T-Zellrezeptor exprimiert. Deswegen konnten antigenspezifische T-Zellen einer Spezifität bisher nur sehr eingeschränkt untersucht werden. Erst in neuester Zeit können T-Zellen mithilfe von gekoppelten MHC-Peptid-Komplexen (MHC-Tetramere) spezifisch angefärbt werden[100,101,102]. Diese Untersuchungen sind aber besonders für MHC-II Moleküle aber noch nicht gut etabliert.

Um antigenspezifische T-Zellen zu untersuchen, werden deswegen auch T-Zellen mithilfe von Antigen kultiviert. Nach genügend langer Zeit erhält man eine T-Zelllinie, bei der alle T-Zellen mit dem Antigen reagieren.

Eine andere Möglichkeit, T-Zellen untersuchen zu können, bei denen man die Antigenspezifität nicht kannte, war das Verschmelzen von T-Zellen mit Thymomzellen[103,104]. Durch diese Technik entstehen unsterbliche Zellen, die den T-Zellrezeptor exprimieren.

Die Nachteile dieser Methoden sind, dass die Zellen durch die lange Kultur eventuell wesentliche Änderung ihres Verhaltens (z.B. Zytokinproduktion oder Migrationsverhalten) aufweisen.

Um die Rolle autoreaktiver T-Zellen *in vivo* genauer untersuchen zu können, wurden Gene von T-Zellrezeptoren aus T-Zelllinien gewonnen und in das Genom von Mäusen transferiert[99,105,106]. Viele T-Zellen exprimieren diesen T-Zellrezeptor nach deren Reifung, wodurch eine Fraktion von spezifischen T-Zellen erhalten wird, die leichter untersucht werden kann.

In dieser Arbeit wurden Mäuse verwendet, bei denen außerdem die endogenen T-Zellrezeptor α -Ketten ausgeschaltet wurden[99]. Da nun außer dem transgenen keine intakten T-Zellrezeptoren gebildet werden können, exprimieren praktisch alle T-Zellen den transgenen T-Zellrezeptor.

Der transgene T-Zellrezeptor ist spezifisch für ein Peptid bestehend aus den N-terminalen 11 Aminosäuren des Myelin-basischen Proteins (MBP), wobei die erste Aminosäure azetyliert sein muss. Das Peptid wird auf dem murinen MHC-II Molekül I-A^u präsentiert. Dadurch sind sämtliche T-Zellen in diesen Mäusen autoreaktiv für ein im ZNS exprimiertes Protein.

Spontan erkranken etwa 14% der Mäuse an EAE. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Fremdorganismen imstande sind, die T-Zellen zu aktivieren.

Durch das stark eingeschränkte T-Zellrezeptorrepertoire ist es möglich, die Spezifität für andere Peptide des T-Zellrezeptors genau zu untersuchen, ohne dass Reaktionen auf Fremdpeptide auf die Aktivierung nicht-autoreaktiver T-Zellen zurückgeführt werden könnte. Somit kann die Hypothese der „molekularen Mimikry“ überprüft werden, da in diesen Mäusen jede Aktivierung der T-Zellrezeptoren durch Fremdpeptide eine Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen bedeutet.

2 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Zusammenhang zwischen Autoimmunität und Infektionen, speziell die Hypothesen der molekularen Mimikry und der „Bystander-Aktivierung“ von T-Zellen, untersucht werden.

Dabei wird folgendermaßen vorgegangen:

1. Zuerst soll das Ausmaß der Kreuzreaktivität des von den Mäusen exprimierten T-Zellrezeptors untersucht werden. Dazu werden Peptide auf Zellulosemembranen synthetisiert, bei denen jeweils an einer Position des MBP_{Ac1-11}-Peptids eine Aminosäure ausgetauscht wurde. An jede Position wird jede natürlich vorkommende Aminosäure gesetzt und die resultierenden Peptide *in vitro* zu Milzzellen gegeben. Anschließend wird die Proliferation gemessen (=Substitutionsanalyse). Durch Auswertung dieser Experimente kann das Supertop des T-Zellrezeptors festgestellt werden.
2. In elektronischen Datenbanken können mithilfe der Ergebnisse der Substitutionsanalyse nach Peptidsequenzen gesucht werden, die in Bakterien vorkommen. Diese Peptide und bakterielle Lysate werden auf Zellulosemembranen und in Pulverform synthetisiert, auf Proliferation von Milzzellen und auf Induktion von EAE in den transgenen Mäusen getestet.
3. Um die Hypothese der „Bystander-Aktivierung“ zu überprüfen, soll der Effekt von Lipopolysacchariden (LPS) auf CD4⁺-T-Zellen *in vitro* in den transgenen und in Wildtypmäusen untersucht werden. Insbesondere interessieren dabei die Proliferation und die Aktivierung der Zellen.
4. Schließlich sollen die *in vivo*-Effekte von LPS auf die transgenen Mäuse untersucht werden. Hierbei wird besonders die Induktion von EAE untersucht, da bei dieser Erkrankung die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen eine Schlüsselrolle spielt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Zusätze

Ammoniumchlorid	Merck
2 β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Antibiotikallösung; enthält 10 000 U/ml	Seromed, Berlin
Penizillin und 10 000 μ g/ml Streptomycin	
Bovines Serum Albumin (BSA)	ICN
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraazetische Säure (EDTA)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Histopaque 1083	Sigma-Aldrich
Ionomycin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Seromed
Phorbol 12-myristate13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Life Tech. Berlin
Saponin	Sigma-Aldrich
Natriumazetat	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Trypan Blau Lösung	Sigma-Aldrich
Komplettes Freunds Adjuvant (CFA)	Sigma-Aldrich
Pertussistoxin (PT)	Sigma-Aldrich
Ethanol (70 %)	Sigma-Aldrich
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
^3H -Thymidin	Amersham
Szintillationsflüssigkeit	Packard
Lipopolysaccharid (von <i>Salmonella typhimurium</i>)	List Biological Lab.
5(6)-Carboxyfluorescein-diazetatsuccinimidylester (CFSE)	SIGMA-Aldrich

3.1.2 Medien und Lösungen

Medien

Komplettes Zellkulturmedium (CM)	RPMI 1640, 10% FCS, 10mM, 20µM 2β Mercapto-ethanol, L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin
----------------------------------	--

Waschmedium (WM)	RPMI, 1% FCS
------------------	--------------

Puffer

Erythrozyten-Lysispuffer	10mM Tris-HCL, 0.83% NH ₄ CL
FACS Puffer	PBS, 0.5 % BSA, 0.02% NaN ₃
MACS Puffer	PBS, 0.5 % BSA, 0.05 % EDTA
Lösung zur Fixierung von Zellen	PBS, 2% Formaldehyd, pH 7.0
Saponin Puffer	PBS, 0.5 % BSA, 0.5% Saponin
PBS	8g NaCL, 0.2g KCL, 1.44g Na ₂ HPO ₄ , 0.24g KH ₂ PO ₄ in 1L H ₂ O, pH 7.4

3.1.3 Materialien

Injektionsspritzen (10 ml)	Henke Sass Wolf GmbH
Injektionsspritzen (2 ml)	Henke Sass Wolf GmbH
Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Eppendorf
Mehrkanalpipette	Labssystem
Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner
Pipettierhilfe, batteriegetrieben	IBS
Mikrotiterplatten	costar
Metallsieb, Maschenweite 0,5 mm	Aesculap
Pinzette	Aesculap
Präparationsschere	Aesculap

Inkubator	heraeus
Zellerntegerät	Packard
β -Counter	Packard
96-Napf-Filterplatten	Packard
Einmalsieb (30 μ m Maschenweite)	Miltenyi
Mikroskop	Zeiss
Zentrifuge	Kendro
Eppendorfröhrchen	Sarstedt
Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Kanüle (18 G; 24 G)	Braun
Rotlicht	Phillips
Zellkulturflaschen	Corning

3.1.4 Mäuse

Mäuse wurden unter pathogenfreien (SPF) Bedingungen in der Tierzucht des DRFZ gezüchtet (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin Marienfelde).

Die folgenden Mausstämme wurden benutzt:

<u>Stamm</u>	<u>Charakteristika</u>
PL/J	H-2 ^u Haplotyp
T ⁺ α ⁻	H-2 ^u Haplotyp, α/β TCR transgene Mäuse[15,99]. Diese transgenen Mäuse exprimieren den $\alpha\beta$ TCR eines enzephalomyelitogenen T-Zellklons (clone 19)[107]. Der TCR erkennt das azetylierte Peptid der ersten 11 Aminosäuren des Myelin-basischen Proteins (MBP) in Verbindung mit dem I-A ^u MHC Klasse II Moleküls. Die endogenen α -Ketten des T-Zellrezeptors sind durch Einsetzen eines Neomycingens ausgeschaltet („knocked out“), so dass ausschließlich der transgene T-Zellrezeptor exprimiert wird.
α ⁻	Da die T ⁺ α ⁻ -Mäuse nicht ausschließlich homozygot für den transgenen T-Zell-Rezeptor sind, besitzt ein Teil der Nachkommen diesen T-Zell-Rezeptor nicht. Da eigene α -Ketten nicht exprimiert werden können, entstehen keine $\alpha\beta$ T-Zellen in diesen Mäusen.

3.1.5 Bakterien

Die von uns verwendeten Bakterien, speziell *Salmonella typhimurium* (Wildtypstamm C5 Nalr), wurden von Dr. U. Schaible, Max-Planck-Institut für Immunologie, kultiviert und uns zur Verfügung gestellt.

3.1.7.2 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

- Antikörper gegen Oberflächenantigene

<u>Antikörper</u>	<u>Klon, Bezeichnung, Quelle</u>
anti-CD4	Klon GK1.5. FITC (Isomer 1), PE und Biotin
Anti-CD8	Klon 53.6.7. PE und FITC gekoppelt
Anti-CD11b	Klon M1/70.15.11. PE und FITC gekoppelt
Anti-CD11c	Klon N418. PE und Cy5 gekoppelt
Anti-B220	Klon RA3-6B2. PE und FITC gekoppelt
Anti-CD80	Klon 16-10A4. Pharmingen. PE gekoppelt
Anti-CD86	Klon GL1. Pharmingen. FITC gekoppelt
Anti-CD28	Klon 37.51. Pharmingen. PE gekoppelt
Anti-CD40L (CD154)	Klon MR1. Pharmingen. PE gekoppelt

- Antikörper gegen Zytokine

<u>Antikörper</u>	<u>Klon, Bezeichnung, Quelle</u>
anti-IFN- γ	Klon XMG1.2. Pharmingen. PE und FITC gekoppelt.
anti-TNF- α	Klon MP6-XT22. Pharmingen. PE gekoppelt
anti-GM-CSF	Klon MP1-229. Pharmingen
anti-IL-2	Klon S4B6. DIG und PE gekoppelt
anti-IL-4	Klon 11B11. PE und DIG gekoppelt
anti-IL-17	Klon TC11-18H10. Pharmingen. DIG
Ratten-IgG	Jackson Immunoresearch Laboratories
Klonotypischer anti-TCR (3H12)	Dr. J. Lafaille

3.1.7.3 Sekundärantikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Klon, Koppelung, Quelle</u>
anti-DIG	FITC und Cy5 gekoppelt
anti-rat IgG	Pharmingen. FITC gekoppelt

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkultur

Die Präparation der Zellen und deren Verarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Alle Kulturen und Assays wurden in kompletten Zellkulturmedium (CM) bei 37°C in einer 5% CO₂ Atmosphäre bei 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.1.2 Präparation von Einzelzellsuspensionen

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Das Fell wurde mit 70% Ethanol gereinigt. Anschließend wurde das Fell und das Peritoneum durchschnitten und die Milz entnommen. Die Milzen wurden durch ein feines Sieb mit einem Spritzenstempel gepresst und in 40 ml Waschmedium aufgenommen. Die Flüssigkeit wurde dann mehrmals in eine Pipette aufgenommen, so dass größere Zellaggregate suspendiert wurden.

Die Zellen wurden nun bei 300 g abzentrifugiert und resuspendiert. Um kleinere Klumpen zu entfernen, wurden die Zellen durch ein 30 µm Sieb gegeben.

Nachdem die Zellen ein weiteres Mal in Waschmedium gelöst und abzentrifugiert wurden, wurden die Erythrozyten lysiert.

Danach konnten die Zellen in der gewünschten Konzentration aufgenommen werden.

3.2.1.3 Lyse der Erythrozyten

Prinzip

Erythrozyten sind anfälliger für hypotonen Schock als Leukozyten und anderen kernhaltigen Zellen. Diese Anfälligkeit nutzt man bei der selektiven Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von Lösungen mit geringer Salzkonzentration.

Generelles Vorgehen

Um Erythrozyten effizient lysieren zu können, werden Einzelzellsuspensionen mit Lysispuffer (0.83% NH_4Cl /10mM Tris-HCl) für 6-7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wird das Röhrchen mit WM aufgefüllt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (bei 200g für 8 min). Das Pellet wird anschließend aufgeschüttelt und in CM aufgenommen.

3.2.1.4 Test der Viabilität von Zellen

Prinzip

Die Viabilität von Zellen kann durch Exklusion von bestimmten Farbstoffen bestimmt werden. Dieser Test beruht auf dem Prinzip, dass bestimmte Farbstoffe wie zum Beispiel Propidiumiodid und Trypan Blau nicht in der Lage sind, intakte Membranen von lebenden Zellen zu durchdringen, wohingegen diese Farbstoffe die Membranen von toten Zellen durchdringen können und sie somit anfärben.

Generelles Vorgehen

Färben von toten Zellen mit Trypan Blau:

20µl einer Einzelzellsuspension wird 1:2 mit Trypan Blau gemischt. Ein Tropfen dieser Mischung wurde auf einen Neubauer-Hämazytometer gegeben. Tote Zellen erscheinen unter dem Mikroskop blau, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Die ungefärbten Zellen können mit einem Mikroskop gezählt werden.

Die Gesamtzahl der lebenden Zellen kann nun wie folgt berechnet werden:

$$\text{Gesamtzahl der lebenden Zellen} = n \times df \times \text{vol.} \times 10^4$$

n : Zellzahl in einem von 4 Feldern des Hämazytometer

df: Verdünnungsfaktor, in diesem Falle 3

vol.: Volumen, in welchem die Zellen gelöst sind

Färbung mit Propidiumiodid:

Die Färbungen mit Propidiumiodid (PI) werden zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen bei einer durchflusszytometrischen Analyse benutzt.

PI färbt die doppelsträngige DNA und führt damit zu einer roten Fluoreszenz, welche proportional zu dem Nukleinsäuregehalt der Zellen ist, wenn diese Zellen blauem Licht ausgesetzt wird.

PI kann Membranen lebender Zellen nicht durchdringen, weswegen nur die DNA toter Zellen angefärbt wird.

PI wird kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse zu den Zellen gegeben. Später werden nur die lebenden Zellen in die Auswertung einbezogen.

3.2.1.5 Messung der Zellproliferation durch ^3H -Thymidin

Prinzip

Vor jeder Zellteilung muss eine Zelle neue DNA synthetisieren. Dazu kann sie die benötigten Nukleinsäuren neu synthetisieren, oder sie nimmt sie bei entsprechendem Angebot durch Transporter aus der Umgebung auf. Bei Zugabe von radioaktiven Nukleinsäuren werden diese in die DNA eingebaut und sich teilenden Zellen radioaktiv markiert.

Die drei Nukleinsäuren Alanin, Guanin und Cytosin werden auch zum Aufbau von RNA verwendet und nicht exklusiv zur Synthese von DNA verwendet. Die Nukleinsäure Thymidin wird ausschließlich für den Aufbau der DNS verwendet. Thymidin mit an die Methylgruppe gekoppeltem Tritium (^3H) kann somit zur Messung der Proliferation verwendet werden. Diese Nukleinsäure wird von proliferierenden Zellen aufgenommen und in die DNA eingebaut, wo die Radioaktivität des β -Strahlers Tritium gemessen werden kann.

Der Vorteil im Vergleich zur später zu besprechenden Proliferationsmessung mit dem Farbstoff CFSE besteht in der einfacheren Durchführung und der Möglichkeit, sehr viele Substanzen auf einmal zu testen.

Generelles Vorgehen

Nach Herstellen einer Einzelzellsuspension und der Lyse der Erythrozyten (siehe oben) werden die Zellen gezählt, abzentrifugiert und in CM in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro Milliliter aufgenommen. Von dieser Zellsuspension werden 100 μl in jedes Nöpfchen einer 96-Napf-Mikrotiterplatte mithilfe einer Mehrkanalpipette pipettiert. Im Falle der in dieser Arbeit häufig verwendeten Testung von Peptiden, die auf einer Zellulosemembran synthetisiert wurden (siehe oben), werden 5 μl der etwa 150-200 μM

Peptidlösung zur Zellpopulation zupipettiert. Ansonsten können je nach Fragestellung auch andere Substanzen zugegeben werden.

Nachdem die Zellsuspension für 3 Tage bei 37°C in einer 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert wurde, wird 1 µCi ³H-Thymidin zugegeben und die Zellen für weitere 18 Stunden inkubiert. Danach werden mittels eines Zellerntegeräts (Hewlett Packard) die Zellen in einer 96-Filter-Platte aufgefangen. Dieser Platte wird Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die Radioaktivität mithilfe eines β-Counters gemessen.

Der gemessene Wert wird in Signale pro Minute (counts per minute, CPM) angegeben. Um das Ergebnis zu normieren, wird jeder Wert durch den Wert der Negativkontrolle (Zellen ohne Zugabe von Peptid) dividiert. Das Ergebnis wird Stimulationsindex (SI) genannt.

3.2.1.6 *Magnetische Zellaufreinigung*

Prinzip

Magnetische Zellaufreinigung (magnetic cell sorting, MACS) wird zur Isolation von spezifischen Zellpopulationen durch magnetische Mikropartikel (20-100 nm Durchmesser), gebunden an Antikörper, eingesetzt. Zellen werden mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert und anschließend gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Zellsuspension wird nun über eine ferromagnetische Matrix gegeben, die in einem starken magnetischen Feld liegt. Die mit magnetischen Partikeln beladenen Zellen werden in dem Magnetfeld festgehalten, während unbeladene Zellen durch die Säule gespült werden. Die beladenen Zellen können gewonnen werden, indem die Säule von dem Magnetfeld entfernt und gespült wird.

Die Zellaufreinigung mit magnetischen Partikeln kann zur Anreicherung (positive Selektion) oder zur Depletion (negative Selektion) von speziellen Zellpopulationen verwendet werden. Die Wahl der Methode hängt von der Art der Untersuchung und von der zu isolierenden Zellpopulation ab.

Generelles Vorgehen

Jeder Schritt der Zellaufreinigung wird in MACS-Puffer (PBS, 0.5% BSA, 2mM EDTA) durchgeführt. Es ist wichtig, das Entstehen von Luftblasen in der Säule zu verhindern. Deswegen werden alle Puffer vor dem Gebrauch durch Anlegen eines Vakuums für etwa eine halbe Stunde entgast.

Eine Einzelzellsuspension wird vorbereitet (s. S. 34). Um verklumpte Zellaggregate zu entfernen werden die Zellen gut suspendiert und anschließend durch ein Sieb gegeben. Die Zellen werden nun in MACS-Puffer aufgenommen, abzentrifugiert und in einer Zellkonzentration von etwa 2×10^8 Zellen pro ml aufgenommen. Die mit magnetischen Partikeln verbundenen Antikörper werden in der entsprechenden Verdünnung hinzugefügt. Die Zellen werden für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen nochmals gewaschen, in einem adäquaten Volumen (meist 5 ml) MACS-Puffer aufgenommen und über die Säule mit der ferromagnetischen Matrix gegeben, der ein starkes Magnetfeld anliegt. Vor der Zugabe der Zellsuspension werden die Säulen mit MACS-Puffer durchspült. Die Menge MACS-Puffer hängt von der Größe der Säule ab. Es wurde hierbei die Menge Puffer verwendet, die vom Hersteller empfohlen wurde.

3.2.1.6.1 Separation von CD4⁺ T-Zellen

Nach Vorbereiten einer Einzelzellsuspension werden die Erythrozyten lysiert und in MACS-Puffer gewaschen (siehe oben). Resuspendiert werden sie in einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml und wie folgt sortiert:

- Positivselektion der CD4⁺ Fraktion: Die Zellsuspension wird für 15 min bei 4°C mit anti-CD4, gekoppelt an magnetische Partikel, inkubiert. Hiernach werden die Zellen zweimal in MACS-Puffer gewaschen, in 5 ml aufgenommen und über die Säule gegeben, die vorher mit MACS-Puffer gespült wurde. Danach wird die Säule drei Mal mit 3 ml gespült, um Zellen zu entfernen, die den Antikörper nicht binden konnten. Diese Zellen können aufgefangen und als antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells, APC) verwendet werden.

Wenn die Flüssigkeit vollständig durch die Säule gelaufen ist, wird die Säule von dem Magneten entfernt und über ein Zentrifugenröhrchen gesetzt. 5 ml MACS-Puffer werden auf die Säule gegeben und das Volumen wird mit einem Spritzenstempel passend zur Säule durch die Säule gespült. Damit werden auch die vorher gebundenen Zellen von der Säule getrennt.

Um eine höhere Reinheit der CD4⁺ Zellen zu erhalten, wird die Zellsuspension über eine zweite Säule gegeben. Die Reinheit der Zellaufreinigung wird

durchflusszytometrisch untersucht. In der Zellsuspension sollten sich über 97% CD4⁺ Zellen befinden.

3.2.1.6.2 Depletion von B220⁺ Zellen

In einigen Experimenten war es nötig, die B220⁺ Zellen aus einer Zellsuspension zu entfernen. Dazu wird zuerst wie oben beschrieben eine Zellsuspension aus einer Mäusemilz hergestellt und die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Die Zellen werden in der vom Hersteller empfohlenen Menge MACS-Puffer suspendiert. Nun werden die Zellen für 15 min mit einem anti-B220 Antikörper, gekoppelt an magnetische Partikel, inkubiert. Danach werden die Zellen zwei Mal in MACS-Puffer gewaschen und über eine Depletionssäule gegeben. Diese Säule muss vorher mit MACS-Puffer gespült werden. Wenn die gesamte Zellsuspension durch die Säule gelaufen ist, werden 3 Mal 3 ml durch die Säule laufen gelassen, um möglichst viele Zellen, welche die B220 Antikörper nicht gebunden haben, aus der Säule zu entfernen. Diese Zellen werden in einem Zentrifugationsröhrchen aufgefangen und stellen die B220 depletierte Zellpopulation dar.

Die Reinheit der Zellen wird durchflusszytometrisch überprüft.

Meist reicht es bei einer Zelldepletion, die Zellen über nur eine Säule zu geben. Falls das Ergebnis der Depletion nicht zufriedenstellend sein sollte, ist es möglich, das Resultat zu verbessern, indem das Eluat über eine zweite Depletionssäule gegeben wird.

3.2.1.7 *Durchflusszytometrie*

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt, um die Expression von Oberflächenmolekülen, die Zytokinproduktion oder die Proliferation von Zellen von definierten Zellpopulationen zu untersuchen. Dazu werden die zu untersuchenden Antigene oder Zytokine mit Antikörpern gefärbt, die an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind. Im Falle der Messung der Zellproliferation werden intrazelluläre Strukturen kovalent mit Farbstoff gefärbt, welcher keine Antikörpereigenschaften besitzt. Die Intensität der Fluoreszenz kann durchflusszytometrisch gemessen werden. In dieser Arbeit wurde ein FACSCalibur benutzt.

Fluoreszenz bedeutet, dass bestimmte Farbstoffe Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Licht anderer Wellenlänge mit einer zeitlichen Verzögerung emittieren.

Da dies spezifisch für die Farbstoffe ist, können bei einer durchflusszytometrischen Analyse mehrere Antigene mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt werden und diese Antigene zueinander auf Einzelzellebene in Beziehung zueinander gesetzt werden.

Um Epitope von Oberflächenmolekülen oder Zytokine anzufärben, können entweder Antikörper, die mit Farbstoffen wie FITC, PE oder Cy5 gekoppelt sind („direkte Färbemethode“), oder Antikörper, die mit Substanzen gekoppelt sind, die erst in einem zweiten Färbeschritt an das eigentliche Fluoreszenz gebunden werden („indirekte Färbemethode“), verwendet werden. Zu letzterer Kategorie gehören Färbungen mit Antikörpern, die mit DIG oder Biotin gekoppelt sind. Dabei wird DIG mit an Fluoreszenzen gekoppelte anti-DIG Antikörper gefärbt, Biotin wird mit an Fluoreszenzen gekoppeltes Streptavidin gefärbt.

Da Biotin auch endogen von den Zellen produziert wird und somit intrazellulär vorhanden ist, sollte dieses System nicht für Intrazellulärfärbungen benutzt werden.

Es können auch Oberflächen- und Intrazellulärfärbungen an den gleichen Zellen vorgenommen werden. In einem solchen Fall werden zuerst die Oberflächenmoleküle gefärbt, dann die Zellen fixiert und die Intrazellulärfärbung vorgenommen.

Prinzip

Die Technik der Durchflusszytometrie basiert auf der Streuung von Licht und der Fluoreszenz von verschiedenen Substanzen. Damit die Streuung beziehungsweise die Fluoreszenz einzelner Zellen gemessen werden kann, werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander durch zwei Laserstrahlen (488 nm und 630 nm, 200 mW) geleitet. Das von den Zellen gestreute und emittierte Licht wird durch ein System von optischen Linsen, Spiegeln, Filtern und Photodetektoren geleitet, so dass das optische Signal in ein elektrisches Signal verwandelt werden kann. Dieses elektrische Signal kann mithilfe eines Computers weiterverarbeitet werden, so dass eine graphische Darstellung und eine statistische Auswertung der gemessenen Parameter für alle Zellen ermöglicht wird.

Der FACSCalibur ist mit einem 480 nm Argonlaser und einem 630 nm Dioden Laser ausgestattet und kann so bis zu sechs verschiedene Parameter aufnehmen:

- Forward scatter (FSC): Streuung längs des Laserstrahls; proportional zur Zellgröße.

-
- Sideward scatter (SSC): Streuung senkrecht zum Laserstrahl; proportional zur Zellgranularität.
 - Fluoreszenz 1: proportional zur Farbintensität von Fluoreszeinisothiocynat (FITC) und CFSE. Beide haben ein Absorptionsmaximum von 492 nm und ein Emissionsmaximum von 520-530 nm.
 - Fluoreszenz 2: proportional zur Farbintensität von Phycoerythrin (PE) mit einem Absorptionsmaximum bei 488 nm und einem Emissionsmaximum bei 570-576 nm.
 - Fluoreszenz 3: proportional zur Farbintensität von Propidiumiodid (PI) und PerCP. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 495 nm und das Emissionsmaximum bei 639 nm. Das Absorptionsmaximum von PerCP liegt bei 490, das Emissionsmaximum bei 675.
 - Fluoreszenz 4: proportional zur Farbintensität von Cy5 und Allophycocyanin mit einem Absorptionsmaximum von 625-650 nm und einem Emissionsmaximum von 660-670 nm.

3.2.1.7.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die Präparation der Proben und das Färben der Oberflächenmolekülen wird in FACS-Puffer (PBS, 0.5% BSA) vorgenommen. Bei jedem Waschschrift werden die Zellen in einer Heraeus Zentrifuge bei 300g zentrifugiert.

Eine Einzelzellsuspension (s. S. 34) wird zentrifugiert und das Pellet in FACS-Puffer aufgenommen. $0,5-5 \times 10^6$ Zellen wurden in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen aufgenommen.

Der von vielen Zelltypen exprimierter $Fc\gamma$ -Rezeptor kann auch die konjugierten Antikörper binden und somit die Zellen unspezifisch anfärben. Um dies zu vermeiden werden die Zellen vor der eigentlichen Färbung mit ungekoppelten anti- $Fc\gamma$ -Rezeptor Antikörpern und Ratten IgG in 90 μ l FACS-Puffer für 10 min bei 4°C inkubiert. Alternativ dazu ist es auch möglich, diese Rezeptoren durch Zugabe von 10% Mäuseserum zu blocken. Diese Methode wurde in dieser Arbeit aber nicht verwendet.

Anschließend werden die Primärantikörper hinzugefügt. Diese Mischung besteht aus den spezifisch an die Oberflächenmoleküle bindenden Antikörpern. Die Antikörper werden gesondert in FACS-Puffer gemischt, wobei die Menge des eingesetzten Antikörpers bei etwa 0,5 bis 7,5 μ g/ml liegt und von der Affinität und Färbeintensität des Antikörpers abhängt. Von dieser Mischung werden 10 μ l zu jeder Zellsuspension

gegeben. Damit ist gewährleistet, dass jede Suspension gleichviel Antikörper erhalten hat.

Die Zellen werden wiederum bei 4°C für 15 min inkubiert und anschließend zwei Mal gewaschen. Wenn auch indirekte Färbungen vorgenommen werden, wird jede Probe mit einer Mischung mit den Sekundärantikörpern inkubiert und nach der Inkubationszeit gewaschen.

Das Pellet wird vor der eigentlichen durchflusszytometrischen Analyse in 300-500 µl FACS-Puffer je nach Anzahl der Zellen aufgenommen und mit dem FACSCalibur gemessen. Die Daten wurden mit den Programmen Cell Quest oder WinMDI analysiert.

Antikörper zur Färbung von Oberflächenantigenen

<u>Zellspezifität</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Klon</u>	<u>Quelle</u>
T-Zellen	α Vβ8.1,8.2 PE	1-5 µg/ml	KJ1-26.1	Pharmingen
	α CD4 Biotin/Cy5	0,5 µg/ml	GK1.5	DRFZ
	α CD4 FITC	0,5µg/ml	GK1.5	DRFZ
	α TCR bio	0,5 µg/ml	3H12	Dr. Lafaille
	(klonotyp.) α CD8 PE/FITC	1µg/ml	53.6.7	DRFZ
Antigen präsentierende Zellen	α CD11b FITC/PE	1µg/ml	M1/70.15.11	DRFZ
	α CD11c Cy5/PE	1-2µg/ml	N418	DRFZ
	α B220 PE/FITC	1µg/ml	RA3-6B2	DRFZ
Kostimulatorische Moleküle und deren Liganden	α CD25 FITC	5µg/ml	PC61	Pharmingen
	α CD62L PE	2µg/ml	MEL-14	Pharmingen

3.2.1.7.2 Färbung von intrazellulären Zytokinen

Um intrazelluläre Zytokine zu färben, reicht es nicht aus, die Antikörper zu den Zellsuspensionen zuzufügen, da diese die Zellmembran nicht durchdringen könnten und somit die Zytokine nicht anfärben würden. Deswegen müssen der Färbung verschiedene andere Schritte vorausgehen. Im einzelnen sind das:

- Die Stimulation der zytokinproduzierenden Zellen und die Zugabe eines Hemmers des intrazellulären Proteintransports während der Zellaktivierung, um eine Anreicherung der Zytokine innerhalb der Zelle zu erreichen.
- Die Fixierung der Zellen, um eine Manipulation der Zellmembran zu erlauben, ohne dass deren Struktur zerstört wird.
- Permeabilisierung der Zellmembran durch ein Detergenz (Saponin, Sigma) um den Durchtritt von Antikörpern zu erlauben und somit die intrazellulären Zytokine anfärben zu können.

Stimulation der Zellen

Die Zellen werden nach Anfertigung einer Einzelzellsuspension *in vitro* mit den entsprechenden Substanzen stimuliert, oder mit dem polyklonal aktivierendem Phorbol ester (PMA) und Ionomycin stimuliert. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro Milliliter suspendiert. PMA wurde in einer Konzentration von 5 ng/ml, Ionomycin in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Peptide wurden meist in der Konzentration von 10 µg/ml, andere Substanzen je nach Fragestellung eingesetzt. Zellen wurden mit diesen Substanzen bei 37 °C in einer 5%CO₂-Atmosphäre bei 95% Luftfeuchtigkeit für 6 Stunden inkubiert. Um die intrazellulären Transportprozesse zu blockieren, wird nach 4 Stunden Brefeldin A in einer Konzentration von 5 µg/ml zugefügt. Nach dieser Zeit werden die Zellen geerntet, zentrifugiert und in PBS gewaschen.

Anschließend folgt die Fixierung der Zellen.

Fixation der Zellen

Die Zellen werden durch Zugabe von 2% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Danach werden die Zellen zwei Mal in FACS-Puffer gewaschen. Nach dieser Fixierung können die Zellen bei 4°C für Wochen gelagert werden, wurden in dieser Arbeit aber nach 24 Stunden analysiert.

Permeabilisierung und Färbung

Alle Färbeschritte werden bei Raumtemperatur in Saponinpuffer (PBS, 0.5 % BSA, 0.5% Saponin) durchgeführt. Wie oben beschrieben werden die Fcγ-Rezeptoren durch Zugabe von anti-Fcγ-Rezeptor Antikörpern und Ratten IgG für 10 min blockiert. Danach werden die Zellen ohne Zentrifugation mit den Primärantikörpern inkubiert. Nach 15 min werden die Zellen gewaschen und bei Bedarf wird der Sekundärantikörper in Saponin hinzugefügt.

Nach diesem Schritt werden die Zellen zwei Mal in Saponin gewaschen und in 300-500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Jetzt kann eine durchflusszytometrische Analyse vorgenommen werden.

Antikörper zum Färben von intrazellulären Zytokinen

<u>Primärantikörper</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Klon</u>	<u>Quelle</u>
α IFN- γ PE	1 μ g/ml	XMG1.2	Pharmingen
α IFN- γ FITC	2.5 μ g/ml	XMG1.2	Pharmingen
α TNF- α PE	0.5 μ g/ml	MP6-XT22	Pharmingen
α IL-2 DIG	2.5 μ g/ml	S4B6	DRFZ
α IL-2 PE	2 μ g/ml	S4B6	Pharmingen
α IL-4 DIG	2 μ g/ml	11B11	DRFZ
α IL-4 PE	2 μ g/ml	11B11	Pharmingen

<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Quelle</u>
α DIG Cy5	1 μ g/ml	DRFZ
α Ratten IgG FITC	1 μ g/ml	Pharmingen

3.2.1.7.3 Messung der Zellproliferation mit CFSEPrinzip

Bei der durchflusszytometrischen Messung der Proliferation wird die Eigenschaft des Farbstoffes 5(6)-Carboxyfluorescein-diazetatsuccinimidylester (CFSE) genutzt[108], sich an intrazytoplasmatische Proteine kovalent zu binden. So erhält jede Zelle eine Färbung ähnlicher Intensität. Im Falle einer Zellteilung wird an jede Tochterzelle die Hälfte des Farbstoffs weitergegeben. Die Intensität ist somit bei jeder Zellteilung um die Hälfte verringert. Diese Abnahme kann durchflusszytometrisch erkannt werden und somit die Anzahl der Zellteilungen jeder Zelle genau festgestellt werden. Der Vorteil im Vergleich zu konventionellen Proliferationsassays mithilfe radioaktiven Thymidins besteht darin, dass die Proliferation bestimmter Zellpopulationen genau ausgewertet werden kann.

Generelles Vorgehen

Um Zellen mit CFSE zu Färben, werden Einzelzellsuspensionen (s. S. 34) angefertigt. Dabei ist es kritisch, die Zellen gut zu suspendieren und durch ein feines Sieb zu geben, damit keine Klümpchen in der Suspension vorhanden sind und alle Zellen dieselbe Menge CFSE aufnehmen.

Die Zellsuspension wird zweimal in PBS gewaschen und anschließend in einer Konzentration von bis zu 5×10^7 Zellen pro Milliliter aufgenommen. Nun wird CFSE in einer Endkonzentration von 2 µg/ml hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension schnell in CM aufgenommen, abzentrifugiert und ein Mal in CM gewaschen.

Die Zellen sind nun mit CFSE gefärbt und werden mit den zu testenden Substanzen oder Zellen vermischt und in Kultur genommen. Nach mehreren Tagen (abhängig von der Fragestellung) können die Zellen der Kultur entnommen, Oberflächenmoleküle oder Zytokine wie oben beschrieben gefärbt und eine durchflusszytometrische Analyse vorgenommen werden.

3.2.1.7.4 Untersuchen der Expression des transgenen T-Zellrezeptors

Jede Maus wurde vor Verwendung in Experimenten auf die Expression des transgenen T-Zellrezeptors untersucht.

Da das Gen für den transgenen T-Zellrezeptor nicht notwendigerweise homozygot bei den $T^+\alpha^-$ Mäusen ist, gibt es Nachkommen, die diesen T-Zell Rezeptor nicht exprimieren.

Der transgene T-Zell Rezeptor besteht aus einer $V\alpha 2$ und einer $V\beta 8$ Kette. Da die endogenen α -Ketten ausgeschaltet sind und ein Rearrangieren der β -Kette nicht mehr möglich ist, exprimiert jede T-Zelle in diesen Mäusen den selben transgenen T-Zell Rezeptor.

Die zu untersuchende Maus wird für etwa 5 Minuten unter ein Rotlicht gesetzt, um die Gefäße zu erweitern. Mit einer scharfen Rasierklinge wird ein kleiner Schnitt am Schwanz der Maus gesetzt und ein mit EDTA gefülltes Röhrchen zum Auffangen der Blutstropfen unter den Schnitt gehalten. Etwa drei Blutstropfen werden gewonnen.

Dieses Blut wird abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100 µl Lysispuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Danach werden die Zellen wiederum abzentrifugiert, in 100 µl PBA aufgenommen, mit dem klonotypischen α TCR-bio (3H12) und α CD4-Cy5 gefärbt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wird nach nochmaligem Waschen der Zellen der Sekundärantikörper Streptavidin-PerCP für 10 min zugegeben.

Bei vielen zu testenden Proben können alle Färbeschritte in einer 96-Napf-Mikrotiterplatte vorgenommen werden.

Anschließend werden die Proben durchflusszytometrisch untersucht.

Mäuse mit einer $V\beta 8^+CD4^+$ Zellpopulation wurden als $T^+\alpha^-$ Mäuse, Mäuse ohne jegliche T-Zellen als α^- Mäuse definiert.

3.2.1.8 Blockade der T-zellrezeptorabhängigen Aktivierung der T-Zellen

Um den Effekt der T-Zellrezeptor-MHC Molekül-Bindung auf die Aktivierung zu untersuchen, werden Moleküle, die zur Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptor nötig sind, spezifisch blockiert.

Zu diesen Molekülen gehören beispielsweise der T-Zellrezeptor selbst, CD4 oder CD3 Moleküle, oder auch die MHC Moleküle der antigenpräsentierenden Zellen. Die Blockade der MHC Moleküle ist dadurch erschwert, dass sie einem sehr schnellen Umsatz unterliegen und somit nicht dauerhaft von Antikörpern blockiert werden können. Da es sich bei den von uns verwendeten Mäusen um Mäuse mit nur einem T-Zellrezeptor handelt und es einen Antikörper gibt, der spezifisch an diesen T-Zellrezeptor bindet, bietet sich eine Blockade mit diesem Antikörper an. Als Kontrolle wurde auch eine Blockade mit CD4 Antikörpern des Typs L3T4 verwendet, da eine Blockade von T-Zellaktivierungen mit diesem Antikörper auch in anderen Systemen etabliert ist.

Beide Antikörper wurden 50fach stärker im Vergleich zu einer FACS-Färbung eingesetzt, um eine vollständige Blockade der entsprechenden Oberflächenmoleküle zu gewährleisten.

Die Antikörper wurden nach Präparation der Zellen vor Zugabe der Peptide bzw. der anderen Substanzen in die Zellkultur zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurden die zu testenden Substanzen direkt zu den Zellen gegeben.

3.2.2 Methoden zur EAE Induktion

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine Krankheit, in der es durch autoreaktive T-Zellen zu Infiltraten und Zerstörungen innerhalb der weißen Substanz des Zentralnervensystems kommt. Diese Zerstörungen bedingen fortschreitende Lähmungen bei den erkrankten Tieren. Es gibt verschiedene Mausstämme, in denen sich diese Krankheit entwickelt. Die Verläufe unterscheiden sich von Modell zu Modell häufig sehr stark voneinander.

Rein systematisch unterscheidet man „aktiv induzierte EAE“ und „passiv induzierte EAE“.

Aktiv induziert bedeutet, dass einer Maus EAE-induzierende Substanzen wie zum Beispiel Selbstpeptide in Adjuvant gespritzt wird. Das Immunsystem der Maus wird durch diese Substanzen aktiviert und reagiert gegen das Zentralnervensystem.

Im Gegensatz dazu steht die passive Induktion der EAE: Hierbei werden einer Maus aktivierte autoreaktive T-Zellen gespritzt. Diese Zellen lösen nun innerhalb der Maus EAE aus.

3.2.2.1 Aktiv induzierte EAE

Für diese Experimente werden $T^+\alpha^-$ -Mäuse verwendet. Diese Mäuse sind transgen für einen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch für die ersten 11 Aminosäuren des Myelin-basischen Proteins (MBP) ist. Außerdem sind die endogenen TCR α -Ketten ausgeschaltet (knocked out), so dass ausschließlich selbstreaktive T-Zellen in diesen Mäusen vorkommen.

In dieser Arbeit wird durch die Induktion von EAE untersucht, ob Peptide oder andere Substanzen, die *in vitro* Proliferation von T-Zellen auslösen konnten, auch *in vivo* krankheitsinduzierend wirken.

Generelles Vorgehen

An Tag 0 wird 100 μ l der zu testenden Substanz (bei Peptiden 200 μ g) in 100 μ l kompletten Freund's Adjuvant (Mineralöl plus Mykobakterien, Complect Freund's Adjuvant, CFA) durch Ultraschall emulgiert.

Der zu untersuchenden Maus wird auf jede Seite der Schwanzbasis je 100 μ l der Emulsion subkutan gespritzt.

24 und 48 Stunden danach wird den Mäusen in 100 μ l PBS gelöstes 200 ng Pertussistoxin (PT) intravenös injiziert.

Nun werden die Mäuse jeden zweiten Tag auf Lähmungen kontrolliert. Abhängig vom Immunogen treten nach etwa 8-14 Tagen erste Lähmungen auf. Diese werden mithilfe eines klinischen Index gewertet:

- Index 1: Der Schwanz ist gelähmt.
- Index 2: Teilweise Paraparese der Hinterläufe.
- Index 3: Vollständige Paralyse der Hinterläufe.
- Index 4: Paralyse der Hinter- und Vorderläufe (bei diesem Zustand werden die Mäuse getötet und als Index 5 für den Rest des Experiments weitergeführt).
- Index 5: Tod der Maus.

Pro Gruppe werden in jedem Experiment stets fünf oder mehr Mäuse verwendet werden, um eine signifikante Aussage zu erhalten.

Um das Ergebnis der einzelnen Mäusen in einem Ergebnis der Gesamtgruppe zu mitteln, werden die klinischen Indizes aller Mäuse addiert und durch die Anzahl der Mäuse dividiert. Obwohl dieses Verfahren statistisch nicht einwandfrei ist, da es sich bei dem klinischen Index um eine Nominalskala handelt und damit das arithmetische Mittel strenggenommen nicht berechnet werden kann, hat sich diese Auswertung bei der Beurteilung der EAE durchgesetzt und wird deswegen in dieser Arbeit auch so vorgenommen.

3.2.2.2 *Passiv induzierte EAE*

Bei diesen Experimenten werden α^- -Mäuse verwendet. Diese Mäuse stammen aus der Zucht der $T^+\alpha^-$ -Mäuse. Da die $T^+\alpha^-$ -Mäuse heterogen für den transgenen T-Zell-Rezeptor sein können, besitzen manche Nachkommen den transgenen T-Zell-Rezeptor nicht. Aufgrund der ausgeschalteten α -Ketten des T-Zell-Rezeptors sind diese Mäuse T-Zell-defizient. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu den $T^+\alpha^-$ -Mäusen können Zellen dieser Mäuse in die α^- -Mäuse transferiert werden.

Generelles Vorgehen

Nach Herstellen einer Einzelzellsuspension von Milzen aus $T^+\alpha^-$ -Mäusen werden diese Zellen für 3 Tage mit 10 $\mu\text{g/ml}$ MBP_{Ac1-11}-Peptid oder anderen Substanzen stimuliert. Danach werden die Zellen mittels magnetischer Zellaufreinigung (magnetic cell sorting, MACS) sortiert oder die Prozentzahl der T-Zellen in der Zellsuspension durchflusszytometrisch analysiert.

Die Zellen werden gezählt, zentrifugiert und $15\text{-}100 \times 10^6$ T-Zellen in 1 ml PBS suspendiert. 100 μl dieser Zellsuspension wird intravenös in eine α^- -Maus gespritzt.

Danach werden die Mäuse beobachtet und deren Krankheit wie oben beschrieben beurteilt.

3.2.3 Histologische Methoden

3.2.3.1 *Perfusion und Fixation der Mäuse*

Prinzip

Um auswertbare Hirnschnitte zu erhalten, ist es erforderlich, autolytische Prozesse sofort nach Entnahme der Gewebe oder nach Töten der Mäuse zu stoppen. Dies geschieht mit Paraformaldehyd, welches Proteine denaturiert und Mikroorganismen abtötet, so dass jede biologische Veränderung des Gewebes verhindert wird.

Generelles Vorgehen

Die zu perfundierende Maus wird in ein Becherglas gesetzt, in welchem sich ein mit etwa 5ml Diethylether getränktes Tuch befindet. Nachdem Apnoe bei der Maus festgestellt wird, wird die Maus dem Becherglas entnommen, die Bauchhaut eröffnet und das Zwerchfell von kaudal eingeschnitten. Der Brustkasten wird links und rechts etwa 4 mm vom Sternum durchschnitten. Es ist darauf zu achten, dass größere Blutgefäße, insbesondere die Arteria thoracica interna, nicht durchschnitten werden.

Das Herz wird freipräpariert, der linke Vorhof eröffnet und eine Kanüle eingeführt. Der rechte Vorhof wird eröffnet. Über die Kanüle wird langsam 50ml PBS in den Ventrikel gespritzt. Danach wird 50ml Paraformaldehyd (4%) in das Herz gegeben.

Da die Substanzen durch den Blutkreislauf schnell an alle Stellen des Körpers verteilt werden, wird eine gleichmäßige Fixation der Mäuse erreicht.

Der Schädel und das Rückenmark werden freipräpariert und über Nacht in Paraformaldehyd (1%) nachfixiert. Danach werden die Gewebe in PBS gelagert.

3.2.3.2 Entwässern und Färben der Gewebe

Generelles Vorgehen

Um Gewebe histologisch untersuchen zu können, müssen sie in einen schneidbaren Zustand gebracht werden, in dünne Scheiben geschnitten und gefärbt werden.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden der Fixation und der Färbung von Zellen, die je nach Fragestellung eingesetzt werden.

Bei unseren Experimenten kommt es auf die Beurteilung der ZNS Infiltrate der Mäuse an. Um ein schneidbares Gewebe zu erhalten, werden diese mit Paraformaldehyd (4%) fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in flüssigem Paraffin bei 62°C eingebettet.

Nach Anordnung der Gewebestücke in flüssigem Paraffin und deren Abkühlung kann der erhärtete Paraffinblock mithilfe eines Mikrotoms in 5-10µm dicke Scheiben geschnitten. Nachdem die Schnitte auf einen Objektträger gelegt werden, werden diese über eine absteigende Alkoholreihe in Wasser gelöst, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Um die Stücke auf dem Objektträger luftdicht haltbar zu machen, wird ein Deckglas mit einem Tropfen Kanadabalsam über dem Gewebestückchen fixiert.

3.2.3.3 Beurteilung der Hirnschnitte

Die Hirnschnitte wurden in dieser Arbeit von Dr. C. Stadelmann und Prof. W. Brück, Institut für Neuropathologie, Charité, beurteilt.

Um einen histologischen Index der experimentellen Enzephalomyelitis zu erhalten, werden alle entzündlichen Infiltrate auf jedem Rückenmarksquerschnitt zusammengezählt und durch die Anzahl der Rückenmarksquerschnitte geteilt. Die dadurch ermittelte mittlere Anzahl Infiltrate pro Querschnitt stellen ein gutes Korrelat zu dem klinischen Index dar und können so diesen absichern.

Außerdem wird die Zellzusammensetzung der Infiltrate beurteilt und deren Verteilung innerhalb des ZNS.

4 Resultate

4.1 Übersicht

In dieser Arbeit wurden Mäuse verwendet, die transgen für einen T-Zellrezeptor sind, der spezifisch für die ersten 11 Aminosäuren des Myelin-basischen Protein ist. Durch die transgenen Tiere, zur Verfügung gestellt von Dr. J. Lafaille, wurde es uns möglich, die Kreuzreaktivität eines T-Zellrezeptors genauer zu charakterisieren. Dies erschien sinnvoll, da Kreuzreaktivität als hypothetische Ursache für Autoimmunität gesehen wird, deren genauer Umfang aber unbekannt ist (siehe auch Seite 19). Wir wollten deswegen als erstes mikrobielle Substanzen identifizieren, die imstande sind, bei den $T^+\alpha^-$ Mäusen EAE auszulösen.

Es wird davon ausgegangen, dass T-Zellen eine ursächliche Rolle für das Entstehen dieser Krankheit spielen (siehe auch Seite 25).

Da T-Zellen spezifisch durch Peptide aktiviert werden, werden mit einer speziellen Technik synthetisierte Peptide systematisch an Milzzellen der $T^+\alpha^-$ Mäusen getestet und die Zellproliferation gemessen.

Ausgewählte Peptide werden später in konventioneller Methode synthetisiert, so dass eine detailliertere Analyse der T-Zellantwort möglich ist.

Der nächste Schritt ist das Untersuchen der T-Zellantwort auf bakterielle Lysate. Damit soll festgestellt werden, ob die kreuzreaktiven Peptide auch bei der Prozession der bakteriellen Proteine überhaupt oder in einer ausreichenden Konzentration entstehen, um T-Zellen suffizient zu aktivieren und Autoimmunität zu erzeugen.

Da bakterielle Lysate nicht ausschließlich Proteine, sondern eine Vielzahl anderer Stoffe enthalten, von denen unter anderem Lipopolysaccharide (LPS) eine wichtige Rolle spielen, wird der Effekt dieser Substanzen auf die Aktivierung der T-Zellen untersucht.

Jeder Effekt, der *in vitro* beobachtet wird, kann in dem verwendeten System schnell *in vivo* überprüft werden. Somit kann getestet werden, ob die Effekte zumindest in diesem transgenen System ausreichend sind, um Autoimmunität auszulösen.

4.2 Das Supertop des $T^+\alpha^-$ T-Zellrezeptors

Die Definition eines Motivs, welches Peptide beschreibt, die potentiell T-Zellen einer Spezifität aktivieren können, wird Supertop genannt. Dabei ist es aber immer eine theoretische Voraussage, und um zu überprüfen, ob die im Supertop definierten Peptide

tatsächlich solche T-Zellen aktivieren können, müssen sie synthetisiert und auf deren tatsächliches T-zellaktivierendes Potential überprüft werden.

Da es gegenwärtig unmöglich ist, rechnerisch zu ermitteln, welche Peptide an MHC-Moleküle und T-Zellrezeptor binden, wäre es zur Ermittlung des vollständigen Supertops eines T-Zellrezeptors also notwendig, sämtliche möglichen Peptide zu synthetisieren und auf deren Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, *in vitro* zu testen. Jedoch gibt es 20 natürlich vorkommende Aminosäuren; ein Peptid, welches von MHC-Molekülen gebunden werden kann, besteht aus etwa 10 Aminosäuren. Damit kämen 20^{10} Kombinationen in Frage (etwa 10^{13} =10 Billionen verschiedene Peptide).

Deswegen wird ein Supertop möglichst so definiert, dass sehr viele von den beschriebenen Peptiden T-Zellen einer Spezifität aktivieren können. Dabei muss immer bedacht werden, dass die tatsächliche Menge von Peptiden, die diese T-Zellen aktivieren kann, dann sehr viel größer ist als die Menge der im Supertop beschriebenen Peptide.

Wie bereits erwähnt, sind die transgenen T-Zellen der $T^+\alpha^-$ Mäuse in dieser Studie spezifisch für das MBP_{Ac1-11}-Peptid (Peptidsequenz ist AcASQKRPSQRSK, wobei Ac die Azetylierung des Alanins an Position 1 des N-terminalen Ende des MBP-Proteins kennzeichnet).

Um das Supertop systematisch zu definieren, wurden Peptide auf Zellulosemembranen synthetisiert[109], die sich von dem ursprünglichen MBP_{Ac1-11}-Peptid in einer Position unterscheiden. Diese Synthese wurde im Institut für medizinische Immunologie der Charité in der Gruppe von Prof. J. Schneider-Mergener durchgeführt.

Da es 20 natürlich vorkommende Aminosäuren gibt, und das MBP_{Ac1-11}-Peptid aus 11 verschiedenen Aminosäuren besteht, sind 220 verschiedene Peptide möglich. Diese wurden auf Zellulosemembranen synthetisiert und zu Zellsuspensionen der $T^+\alpha^-$ Mäuse gegeben. Die Zellproliferation wurde nach 3 Tagen durch Messung von inkorporiertem ^3H -Thymidin bestimmt (siehe Seite 36).

Diese Methode wird Substitutionsanalyse genannt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt.

Eine Proliferation von mehr als das 15-fache der Negativkontrolle wurde als signifikante Proliferation gewertet. Die Summe der Substitutionen, die diesen willkürlich gewählten Wert überschritten, wurden als Supertop definiert.

	A	S	Q	K	R	P	S	Q	R	S	K
A	60	29	1	41	1	1	50	51	51	63	56
C	12	15	4	35	2	4	26	52	47	43	56
D	3	4	3	50	1	2	16	39	50	35	56
E	5	8	4	45	1	2	11	45	45	31	56
F	2	9	16	59	1	2	14	89	91	45	47
G	10	13	4	59	1	2	23	67	92	53	74
H	5	15	29	62	1	4	21	94	115	98	69
I	8	12	6	82	3	5	41	82	76	68	54
K	7	12	6	59	1	2	26	66	66	65	69
L	6	11	14	53	2	4	35	58	71	62	55
M	7	13	31	53	3	6	31	91	96	61	60
N	9	17	10	39	2	10	61	90	94	62	36
P	11	12	3	37	1	63	16	31	94	79	67
Q	12	14	48	60	1	24	17	55	82	70	58
R	12	15	12	65	65	6	17	73	76	65	38
S	18	77	11	84	5	4	81	86	98	69	53
T	14	15	10	60	4	5	75	69	81	69	67
V	9	13	6	52	4	6	93	68	91	83	52
W	9	11	8	74	3	6	13	85	76	85	36
Y	8	10	11	43	2	4	14	77	67	71	50

Abbildung 4 Substitutionsanalyse $T^+ \alpha^-$ Zellen: Milzzellen der $T^+ \alpha^-$ Mäuse wurden mit Peptiden stimuliert, bei welchen eine Aminosäure des MBP_{Ac1-11}-Peptids für eine andere substituiert wurde. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und aus den Werten das arithmetische Mittel gebildet. Die Standardabweichung betrug zwischen 15 und 20%. Die erste Zeile gibt die Sequenz des MBP_{Ac1-11}-Peptids wieder. Jede Spalte der Tabelle stellt eine Position des MBP_{Ac1-11}-Peptids dar. Die erste Spalte gibt an, welche Aminosäure substituiert wurde. Die Proliferation ist durch den Stimulationsindex (Absolutwert dividiert durch die Negativkontrolle) angegeben. Ein Stimulationsindex (=SI) von größer gleich 15 wurde als signifikante Proliferation gezählt (durch schwarzen Hintergrund hervorgehoben). Der Absolutwert der Negativkontrolle (=kein Peptid zugegeben) betrug 2893 Signale pro Minute (counts per minute, CPM), der Absolutwert der Positivkontrolle (=MBP_{Ac1-11} zugegeben) betrug 198467 CPM. Der SI der Positivkontrolle betrug somit 69, der SI der Negativkontrolle 1.

Nach dieser Methode kann man das Supertop wie folgt darstellen:

[AS] - [ACHNS] - [FHMQ] - X - [R] - [PQ] - {EFWY} - X - X - X - X

Bindestriche trennen die einzelnen Positionen.

Eckige Klammern kennzeichnen an dieser Stelle erlaubte Aminosäuren, geschweifte Klammern geben Aminosäuren an, die an dieser Stelle nicht erlaubt sind. X bedeutet, alle Aminosäuren dürfen an dieser Position substituiert werden.

Wird das Supertop so definiert, gilt für die eingeschlossenen Peptide, dass keine Rücksicht auf Änderungen an anderen Positionen genommen wird, solange nur Peptide ersetzt werden, die nach dem Supertop „erlaubt“ sind.

Diese Annahme ist jedoch *in vitro* nicht uneingeschränkt gültig, da die verschiedenen Aminosäuren eines Peptides nicht unabhängig voneinander sind, sondern sich beeinflussen. Somit kann eine Substitution eine andere möglich machen beziehungsweise ausschließen.

Somit ist klar, dass dieses theoretische Supertop auch Peptide beschreibt, die *in vitro* keine T-Zellaktivierung hervorrufen können. Trotzdem stellt das theoretische Supertop eine gute Grundlage dar, Peptide zu finden, die tatsächlich die transgenen T-Zellen aktivieren können.

In dem Supertop, dass durch unsere Experimente definiert wurde, sind die für die MHC-Peptid-Bindung benötigten Aminosäuren, also die Ankerpositionen an Position 4 und 5 (siehe auch Pearson et al.[110]), nur an Position 5 konserviert. An Position 4 ist demgegenüber jede beliebige Aminosäure substituierbar, ohne dass die T-Zellaktivierung eingeschränkt würde. Dabei ist bekannt, dass das MBP_{Ac1-11}-Peptid ein schlechter Binder an das I-A^u-MHC-Molekül ist[111]. Diese Befunde zeigen, dass eine gute Bindung an ein MHC-Molekül eine Aktivierung von T-Zellen vereinfachen kann, jedoch nicht unbedingt notwendig sein muss.

An den Positionen 3 und 6, die für die Bindung an den T-Zellrezeptor notwendig sind[110], können nur wenige Aminosäuren substituiert werden, ohne dass die T-Zellaktivierung verloren geht.

4.3 Mikrobielle, kreuzreaktive Peptide

Um mikrobielle oder virale Peptide zu finden, die dem Supertop entsprechen, wurden die SWISS und TREMBL Datenbanken mithilfe der ExPasy Software im Internet (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite>) nach dem Supertop durchsucht[112].

Es wurden 832 Peptide gefunden, die erstens dem Supertop entsprechen und zweitens in Bakterien oder Viren exprimiert werden. Diese Peptide wurden auf Zellulosemembranen synthetisiert und auf deren Fähigkeit, Milzzellen der T⁺α⁻-Mäuse zu Proliferation anzuregen, untersucht. Es wurde wie im vorhergehenden Versuch die Inkorporation von ³H-Thymidin gemessen. Die Signalstärke der Negativkontrolle (PBS) war 2083 CPM, die Signalstärke des MBP_{Ac1-11}-Peptides war 167000 CPM.

Von den 832 Peptiden erreichten 61 Peptide einen Stimulationsindex von mehr als 50 (d.h. mehr als 104134 CPM). Dieser Wert wurde willkürlich sehr hoch angesetzt, um auszuschließen, dass auch Peptide, welche die Milzzellen nur suboptimal stimulieren, als positive Peptide erfasst werden. Die 61 Peptide sind in Abbildung 5 dargestellt.

4.4 Charakterisierung der T-Zellantwort auf ausgewählte mikrobielle Peptide

Die 61 Peptide induzieren Proliferation, allerdings ist bei der oben beschriebenen Methode die Konzentration der Peptide in den Lösungen nur annäherungsweise zu bestimmen. Abgesehen von den Unterschieden in der Menge synthetisierten Peptides ist insbesondere bei unterschiedlichen Löslichkeiten zweier Peptide in Wasser mit einer unterschiedlichen Endkonzentration zu rechnen. Deswegen sind die Ergebnisse relativ ungenau, außerdem kann keine Aussage über die Dosisabhängigkeit der T-Zellaktivierung bei verschiedenen Peptiden gemacht werden.

Um bessere Vergleichbarkeit und genauere Aussagen über die Dosisabhängigkeit und der Art der von den T-Zellen produzierten Zytokine zu erreichen, war es somit erforderlich, die zu untersuchenden Peptide nach einer konventionellen Methode (Fmoc-Technik) in Pulverform zu synthetisieren und in einer definierten Konzentration zu lösen. Die Synthese der Peptide wurde von der Gruppe von Prof. J. Schneider-Mergener übernommen.

Aufgrund des erheblichen Zeit- und Kostenaufwandes konnten allerdings nicht alle 61 Peptide in Pulverform synthetisiert werden.

Wie aus Abbildung 5 erkennbar wurden Peptide aus einer Vielzahl auch häufig vorkommender Organismen wie zum Beispiel dem Darmbakterium *Escherichia coli* oder der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden, die Peptide enthalten, welche die MBP_{Ac1-11}-spezifischen T-Zellen aktivieren können.

Wir entschieden uns, Peptide genauer zu untersuchen, die in Organismen vorkommen, die nicht im Verdacht stehen, ursächlich mit dem Entstehen von EAE oder MS in Verbindung zu stehen. Damit wäre gezeigt, dass unter speziellen Bedingungen das Auslösen von Autoimmunität durch molekulare Mimikry möglich ist. Da dann aber auch ubiquitär vorkommende Bakterien kreuzreaktiv zu dem untersuchten T-Zellrezeptor wären, sollte es unter physiologischen Bedingungen Mechanismen geben, die das Hervorrufen von Autoimmunität durch Kreuzreaktivität eines T-Zellrezeptors verhindern.

Peptidnr.	Organismus	Sequenz	Sequenz-homologien	Signalstärke (CPM)	Stimulationsindex
0	MBP _{Ac1-11} -Peptid	ASQKRPSQRSK	11	167000	80
41	<i>Acetobacter xylinum</i>	AHWRPALAGM	3	240000	115
129	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ACQCRPTSDAV	4	250000	120
87	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AQNRPSGPRK	5	200000	96
32	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	AHNRQHFAVH	2	133705	64
443	<i>Alcaligenes faecalis</i>	ATHYRPRSAYR	3	190000	91
64	<i>Aspergillus niger; Aspergillus ficuum</i>	AQARPVVDER	4	323333	155
403	<i>Aspergillus parasiticus</i>	ASQNRPRDDVQ	5	193333	93
376	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	ASMLRQHGLPA	3	150000	72
38	<i>Bacillus subtilis</i>	AHSRPRVRLRY	3	313333	150
6	<i>Bacillus subtilis</i>	AFHRPKRFFG	3	246667	118
684	<i>Borrelia burgdorferi</i>	SSFFRPILLQD	3	160000	77
381	Bovine herpesvirus type 1	ASMRPRARTFC	4	186667	90
745	<i>Candida albicans</i>	SSQLRPATNGS	4	206667	99
19	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AFYRPNVNL	3	310000	149
740	<i>Cryptococcus neoformans</i>	SSQIRPKKALK	4	104770	50
741	<i>Entamoeba histolytica</i>	SSQIRPLLQTA	4	233333	112
51	<i>Escherichia coli</i>	AMLRPILLEAN	3	370000	178
7	<i>Escherichia coli</i>	AFIRPVPSG	4	107359	52
183	<i>Escherichia coli</i>	ANFYRPI TMQR	3	210000	101
383	<i>Escherichia coli; Salmonella typhimurium</i>	ASMSRPVKQLK	4	223333	107
409	<i>Haemophilus influenzae</i>	ASQSRPAPFLI	5	156667	75
185	<i>Haemophilus influenzae</i>	ANHLRPVRSGL	3	150000	72
746	<i>Haemophilus influenzae</i>	SSQLRPDTASQ	5	112600	54
706	<i>Helicobacter pylori</i>	SSHARPAFKGL	3	233333	112
61	Herpes simplex virus (type 1/strain 17)	AQARPRPVAV	4	303333	146
100	<i>Herpesvirus saimiri</i>	AQRRPSRPFR	5	203333	98
722	Human papillomavirus type 7	SSHNRQREQPT	2	118552	57
156	<i>Leishmania major</i>	AHQLRPGWSP	4	273333	131
500	<i>Leishmania major</i>	SAHLRPLTDM	2	226667	109
85	<i>Leishmania mexicana</i>	AQMRPDIEIV	4	233333	112
574	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	SHQIRPVCGR	3	130000	62
111	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AQYRPDELAR	4	290000	139
63	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AQARPVKTVI	4	263333	126
471	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATQYRPDQLAK	5	160000	77
705	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	SSFYRPTQPGS	4	253333	122
364	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ASHQRQRAFAQ	3	147075	71
120	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ACFTRPARWTL	3	139182	67
378	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ASMNRPNLVAL	4	233333	112
77	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AQHRQIVADF	3	126667	61
108	Newcastle disease virus	AQTRPNGALG	4	276667	133
106	Newcastle disease virus	AQTRPMIHGG	4	226667	109
107	Newcastle disease virus	AQTRPNGAHG	4	223333	107
42	<i>Pneumocystis carinii</i>	AMARPVKRQA	4	370000	178
146	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	AHHVRPPALVV	3	343333	165
30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AHLRQRPSLD	2	256667	123
736	<i>Reclinomonas americana</i>	SSQFRPIHRKL	5	180000	86
543	Reovirus	SAQVRPGNRSL	5	213333	102
347	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ASFLRPGTEQI	4	133498	64
521	<i>Rhodococcus fascians</i>	SAQARPTPKSV	4	107207	51
505	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SAHYRPPNLLN	2	125391	60
76	<i>Schizophyllum commune</i>	AQHRPAAQHR	4	260000	125
540	Simian 11 rotavirus	SAQSRPSNVG	4	126667	61
366	<i>Sphingomonas aromaticivorans</i>	ASHWRP TSANY	4	183333	88
411	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ASQVRPQGRPA	6	163333	78
109	<i>Streptomyces coelicolor</i>	AQVRP L L PGT	4	233333	112
97	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AQQRQPAHLL	3	256667	123
375	<i>Treponema pallidum</i>	ASMKRPLFEFS	5	190000	91
726	<i>Trypanosoma cruzi</i>	SSHYRPTNEAE	3	186667	90
112	<i>Vibrio cholerae</i>	AQYRQLGYWQ	3	216667	104

Abbildung 5: 61 Peptide mikrobieller oder viraler Herkunft lösen Proliferation in Milzzellen der T⁺α⁻-Mäuse aus. Die Messung wurde drei Mal durchgeführt und das geometrische Mittel gebildet. Angegeben ist die Signalstärke in counts per minute (CPM). Die Standardabweichung der Signalstärke betrug zwischen 15 und 20%. Die Signalstärke der Negativkontrolle betrug 2083 CPM. Peptide, die eine Proliferation hervorriefen, dass die Signalstärke 50-mal so groß wie die Negativkontrolle ist (104134 CPM), wurden als positiv gewertet. Insgesamt wurden 832 Peptide getestet. Substituierte Aminosäuren, d.h. Aminosäuren, die sich von der MBP_{Ac1-11}-Peptid-Sequenz unterscheiden, sind schwarz hinterlegt.

Peptidnummer	Peptidsequenz	Protein	Organismus
MBP _{Ac1-11}	AcASQKRPSQRSK	Myelin-basisches Protein	Mus musculus (Maus)
200	ANMQRQAVPTL	DNA-abhängige RNA Polymerase β -Kette	Buchnera aphidicola, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Salmonella typhimurium
378	ASMNRPNLVAL	Hypothetisches 145.8 KD Protein RV2006.	Mycobacterium tuberculosis
383	ASMSRPVKQLK	Periplasmatisches β -Glucosidase Vorläuferprotein	Escherichia coli, Salmonella typhimurium
387	ASQARQLADSY	Aminopeptidase A/I	Escherichia coli

Abbildung 6: In Pulverform synthetisierte Peptide: Die Peptide MBP_{Ac1-11}, 378 und 383 lösen Proliferation von T⁺ α -Milzzellen aus. Das Peptid MBP_{Ac1-11} ist als Positivkontrolle synthetisiert worden. Die Peptide 200 und 387 lösen keine Proliferation aus und sind als Negativkontrolle synthetisiert worden.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden 5 Peptide ausgewählt und synthetisiert (siehe Abbildung 6).

4.4.1 Mikrobielle Peptide induzieren Proliferation von T⁺ α -Milzzellen

Einer suffizienten Aktivierung einer T-Zelle folgt die Proliferation der Zelle. Ein starker T-Zellrezeptoragonist ist durch eine Induktion der T-Zellproliferation auch schon bei geringen Konzentrationen des Agonisten gekennzeichnet. Um Peptide auf deren Immunogenität in einem bestimmten System zu untersuchen, ist die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve unerlässlich.

Es wurden Milzzellsuspensionen (s. S. 34) vorbereitet. Die zu untersuchenden Peptide wurden in absteigenden Konzentrationen zu den Suspensionen zugegeben und nach drei Tagen ³H-Thymidin zugegeben und die Inkorporation des radioaktiven Thymidins 18 Stunden später untersucht.

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Peptide 383 und 378, die in der Analyse der auf Zellulosemembranen synthetisierten Peptide Proliferation hervorrufen konnten, induzieren in diesem Experiment Proliferationen der Milzzellen, die mit der Proliferation

induziert durch das MBP_{Ac1-11}-Peptid vergleichbar sind. Auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen ist bei allen drei Peptiden noch Proliferation zu detektieren. Dies ist sehr wichtig, da ein Einwand gegen die Relevanz der Kreuzreaktivität sein könnte, dass die *in vitro* verwendeten Peptidkonzentrationen um ein Vielfaches höher sind als die *in vivo* erreichten und somit eine Vielzahl der *in vitro* entdeckten kreuzreaktiven Peptide *in vivo* keine Rolle spielten, da die zur T-Zellaktivierung benötigten Peptidkonzentrationen nicht erreicht werden.

In diesem System stimulieren die kreuzreaktiven Peptide auch bei niedrigen Konzentrationen die T-Zellen ähnlich wie das MBP_{Ac1-11}-Peptid. Das MBP_{Ac1-11}-Peptid kann *in vivo* T-Zellen aktivieren, deswegen sollten die Konzentrationen der kreuzreaktiven Peptide theoretisch auch *in vivo* erreicht werden können.

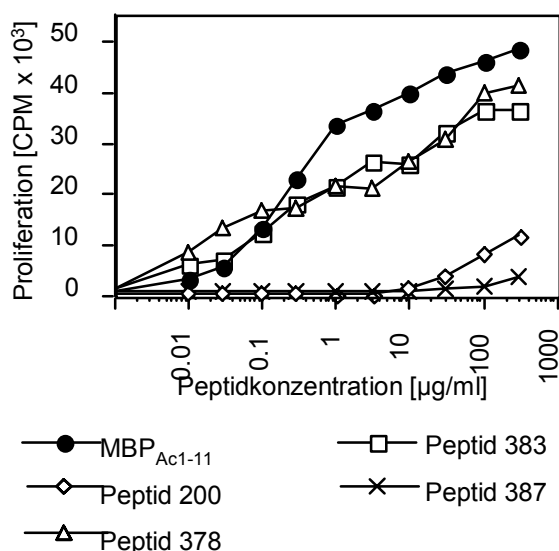


Abbildung 7 Proliferation der T⁺α⁻ Milzzellen auf verschiedene Peptidkonzentrationen. T⁺α⁻ Milzzellen wurden mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen stimuliert und die Inkorporation von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Es ist die Peptidkonzentration gegen die induzierte Proliferation aufgetragen.

4.4.2 Zytokinproduktion T⁺α⁻ Milzzellen induziert durch mikrobielle Peptide

CD4⁺ T-Zellen wirken auf andere Zellen durch die Produktion von Zytokinen. Außerdem werden CD4⁺ T-Zellen aufgrund der von ihnen produzierten Zytokine verschiedene Klassen eingeteilt.

Um die von den T⁺α⁻-Zellen synthetisierten Zytokine zu analysieren, wurden die Zytokine (IFN-γ, IL-2, TNF-α, IL-4) intrazellulär angefärbt und mittels

Durchflusszytometrie ausgewertet. Das Ergebnis der intrazellulären TNF- α Färbung ist in Abbildung 8 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Peptide 378 und 383, die Proliferation der Milzzellen hervorrufen konnten, Produktion des Zytokins TNF- α in CD4⁺-Zellen induzieren. Die Kontrollpeptide 200 und 387 induzieren keine Zytokinproduktion. IFN- γ und IL-2 wurden in ähnlich wie TNF- α durch MBP_{Ac1-11} und die Peptide 383 und 378 induziert, nicht aber durch die Kontrollpeptide. IL-4 wurde durch keins der getesteten Peptide induziert (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde mithilfe der ELISA-Technik die Dosis-Wirkungskurven für die Induktion verschiedener Zytokine angefertigt[113] (Daten hier nicht gezeigt). Dabei wurde deutlich, dass die Peptide 378 und 383 auch in geringeren Konzentrationen die Produktion der getesteten Th1-Zytokine IL-2, IFN- γ in demselben Umfang wie MBP_{Ac1-11} induzierten.

Th2-Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-10) wurden weder durch MBP_{Ac1-11} noch von den mikrobiellen Peptiden induziert.

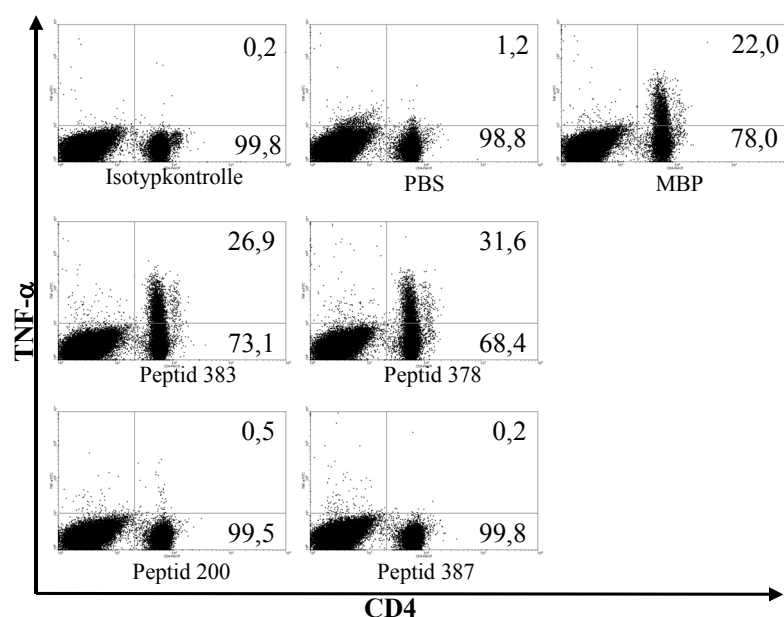


Abbildung 8 TNF- α Produktion nach Stimulation mit mikrobiellen Peptiden. Milzzellen von T⁺ α ⁻ Mäusen wurden mit 10 μ g/ml der angegebenen Peptide stimuliert. Nach der extrazellulären CD4-Färbung und der intrazellulären TNF- α Färbung wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Um das Ausmaß unspezifischer Bindungen des TNF- α -Antikörper zu ermitteln, wurde mit einem isotypischen Antikörper (Ratten IgG₁) gefärbt (Isotypkontrolle). Die y-Achse kennzeichnet die Intensität der TNF- α -Färbung, die x-Achse die Intensität der CD4-Färbung. Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle. Die Zahlen geben den Anteil TNF- α produzierender (obere Zahl) bzw. nicht produzierender (untere Zahl) CD4⁺-Zellen in Prozent an.

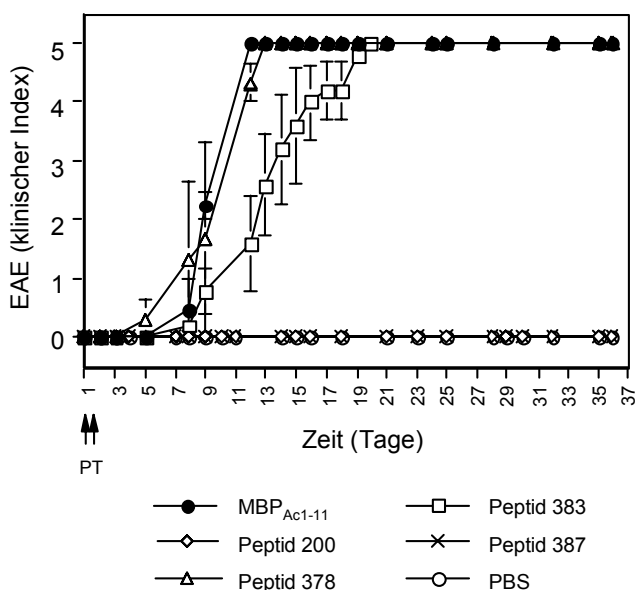


Abbildung 9 EAE Induktion in $T^+\alpha^-$ -Mäusen. 5 $T^+\alpha^-$ wurden mit je 200 μg der angegebenen Peptide immunisiert. Die Peptide waren in 100 μl PBS gelöst, wurden in 100 μl Kompletten Freund's Adjuvant emulgiert. Jeder Maus wurden je 100 μl des Emulgats subkutan zu beiden Seiten der Schwanzbasis injiziert. Nach 24 und 48 Stunden wurde jeder Maus 200 ng Pertussis Toxin in 100 μl PBS intravenös injiziert. Die Mäuse wurden alle 2 bis 3 Tage auf Symptome von EAE untersucht. Klinischer Index (siehe auch Seite 47): 0 - Maus gesund; 1 – Schwanz gelähmt; 2 – Teilweise Paraparese der Hinterläufe; 3 – Vollständige Paralyse der Hinterläufe; 4 – Paralyse der Hinter- und Vorderläufe; 5 – Tod. Bei einem Index von 4 wurden die Mäuse getötet und für den Rest des Experiments als Index 5 gewertet.

Die Kontrollpeptide 200 und 387 induzierten auch bei hohen Konzentrationen (bis zu 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kein getestetes Zytokin in messbaren Mengen.

In vitro konnten somit keine relevanten Unterschiede betreff der Induktion von Proliferation von Milzzellen und der Produktion von Zytokinen durch CD4^+ -Zellen zwischen den mikrobiellen Peptiden 378 und 383 festgestellt werden.

4.4.3 Induktion von EAE durch mikrobielle Peptide

Obwohl gezeigt wurde, dass die T-Zellen der transgenen Mäuse nach Stimulation mit mikrobiellen Peptiden bezüglich der Proliferation und der Produktion von inflammatorischen Zytokinen sehr ähnlich aktiviert werden wie durch das $\text{MBP}_{\text{Ac1-11}}$ -Peptid, kann durch *in vitro* Experimente nicht gezeigt werden, dass diese Peptide auch *in vivo* in der Lage sind, Autoimmunität hervorzurufen.

Deswegen wurden $T^+\alpha^-$ -Mäusen mit den Peptiden immunisiert und auf das Entstehen der Autoimmunkrankheit EAE hin beobachtet (Abbildung 9).

Am Tag 0 wurden die Peptide vor der Immunisierung in kompletten Freund's Adjuvant (CFA, Mineralöl mit abgetöteten Mykobakterien) emulgiert und den Mäusen seitlich der

Schwanzbasis 200 µl (100 µl auf jede Seite) subkutan injiziert. Jeder Maus wurden auf diese Weise 200 µg Peptid in 100 µl PBS und 100 µl CFA injiziert.

Je 24 und 48 Stunden später wurde jeder Maus 200 ng Pertussistoxin intravenös appliziert. Dieses Toxin wird zur Auslösung von EAE in vielen Modellen verwendet, obwohl dessen genaue Wirkungsweise unbekannt ist (siehe Seite 24).

Die Mäuse wurden alle 2 bis 3 Tage auf das Auftreten von Lähmungen hin untersucht (siehe auch Seite 47).

Mit den Peptiden, die *in vitro* eine Aktivierung von T-Zellen auslösen konnten, konnte auch die Autoimmunkrankheit EAE in den transgenen Mäusen ausgelöst werden. Auf der anderen Seite erkrankten die Mäuse nicht an EAE, die mit PBS und mit Peptiden, die *in vitro* keine Aktivierung hervorriefen, immunisiert wurden.

Somit sind die EAE auslösenden Eigenschaften des MBP_{Ac1-11}-Peptides sowie der kreuzreaktiven mikrobiellen Peptide sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ähnlich. Allerdings könnte es sein, dass die Peptide bei einer Prozessierung der mikrobiellen Proteine überhaupt nicht entstehen. Außerdem werden die Proteine von den Organismen nicht unbedingt in Konzentrationen synthetisiert, die ausreichend sind, um genügend kreuzreaktives Peptid entstehen zu lassen. Somit ist nicht gezeigt, dass auch die Proteine oder die Mikroben *in vivo* EAE auslösen können.

4.5 Induktion von EAE durch „Bystander Activation“

4.5.1 Antwort der T-Zellen auf Lysate von *S. typhimurium*

Obwohl diese mikrobiellen Peptide Induktoren der Autoimmunkrankheit EAE sind, und somit die Kreuzreaktivität des MBP_{Ac1-11} T-Zellrezeptors der verwendeten Mäuse zu diesen Peptiden aufweist, bleibt die Frage, ob die Proteine der Bakterien von den antigenpräsentierenden Zellen der Maus auch so prozessiert werden, dass diese Peptide entstehen.

Um dies zu überprüfen, untersuchten wir die Eigenschaften auf die T⁺α⁻-T-Zellen von Lysaten von *Salmonella typhimurium*. Diese wurden von Dr. U. Schaible kultiviert. Nach der Anzucht der Bakterien wurden diese durch Ultraschall lysiert, um ein Überwachsen der Zellkulturen mit Salmonellen zu verhindern.

In diesen Bakterien kommt das kreuzreaktive Peptid 383 im periplasmatischen β-Glucosidase Vorläuferprotein vor. Dieses Bakterium wurde ausgewählt, weil es sich einfach kultivieren lässt und das Peptid 383 von uns auf dessen Fähigkeit zur

Aktivierung der T-Zellen genau charakterisiert wurde. Eine Assoziation einer *Salmonella typhimurium*-Infektion und einer MS-Erkrankung wurde bislang noch nicht beobachtet.

Diese Lysate wurden Milzzellen zugegeben und die T-Zellproliferation untersucht. Ein minimaler Effekt wurde beobachtet (siehe Abbildung 10).

4.5.2 *In vitro* Antwort der T-Zellen auf LPS im Vergleich zu Lysaten und Peptiden

Da die bakteriellen Lysate aber auch andere immunstimulatorische Substanzen enthalten, wurden zur Kontrolle Lipopolysaccharide (LPS) den Zellkulturen zugesetzt.

4.5.2.1 *Proliferation von T-Zellen*

Bei Zugabe von 2µg/ml LPS zu den Zellkulturen kommt es auch zu einer geringen T-Zellproliferation (siehe Abbildung 10). Diese T-Zellantwort ist ähnlich wie die Antwort, die bei Zugabe von bakteriellen Lysaten beobachtet wird. Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt auf die transgenen Mäuse beschränkt ist, wurden auch PL/J-Mäuse untersucht. Dies ist ein Inzuchtstamm, der genetisch nicht verändert wurde. Es zeigte sich, dass die T-Zellproliferation auf LPS auch bei diesen Mäusen beobachtet werden konnte.

Da die zu beobachtende proliferative Antwort der T-Zellen auf LPS und Lysat sehr klein ist und die Aussage aus einzelnen Experimenten nicht möglich, wurden die Experimente oft wiederholt. Es zeigte sich, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind und ein geringer Anteil (etwa 1 %) der T-Zellen durch Lipopolysaccharide zur Proliferation angeregt werden.

Die Messung der durch LPS induzierten Proliferation in T⁺α⁻-Mäusen wurde beispielsweise 5 Mal durchgeführt. Der Mittelwert der proliferierenden T-Zellen bei LPS war 1,2% und bei PBS 0,3%. Das Konfidenzintervall für LPS war 1,0%-1,4% und bei PBS 0,2%-0,4% (p<0,015).

Zwar wird versucht, unspezifische Bindungen durch Blockade der Fcγ-Rezeptoren und durch Zugabe von Rattenimmunglobulin zu verhindern. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Vielzahl der B-Zellen und Makrophagen, die nach LPS-Gabe proliferieren, einige den CD4 Antikörper unspezifisch binden. Dieses kann durch Untersuchung von entsprechenden Isotypkontrollen ausgeschlossen werden. Somit können selbst so geringe Unterschiede der Proliferation von CD4⁺ Zellen

zwischen Negativkontrolle und LPS ein Hinweis auf einen Effekt von LPS auf die CD4⁺ Zellen sein, jedoch war es sehr wichtig, zur weiteren Überprüfung der Ergebnisse andere Aktivierungsmarker zu untersuchen.

4.5.2.2 *Änderung von aktivierungsabhängigen Oberflächenmolekülen nach LPS Stimulation*

Um eine bessere Aussage bezüglich der Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen zu erhalten, wurde nach der Regulation von verschiedenen Aktivierungsmarkern geschaut. Zellaktivierungsmarker sind Moleküle, die sich bei der Aktivierung von T-Zellen verändern. Dazu gehören beispielsweise CD62L (L-Selektin), welches nach Aktivierung der Zellen weniger exprimiert wird, oder CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors), welches nach Aktivierung stärker exprimiert wird als bei naiven bzw. unstimulierten Zellen.

Bei diesen Untersuchungen wurden Milzzellen von T⁺ α ⁻-Mäusen entnommen, Zellsuspensionen hergestellt und diese mit den zu untersuchenden Substanzen wie üblich für 3 Tage stimuliert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Nach Stimulation der Zellen mit LPS wird CD62L sehr viel weniger exprimiert als nach Zugabe von PBS. CD25 wird nach LPS Stimulation etwas höher exprimiert als bei der Negativkontrolle, aber bei weitem nicht so hoch wie bei Zugabe von MBP_{Ac1-11} Peptid bzw. Peptid 383. Dennoch werden beide Aktivierungsmarker aber durch Zugabe von LPS beeinflusst.

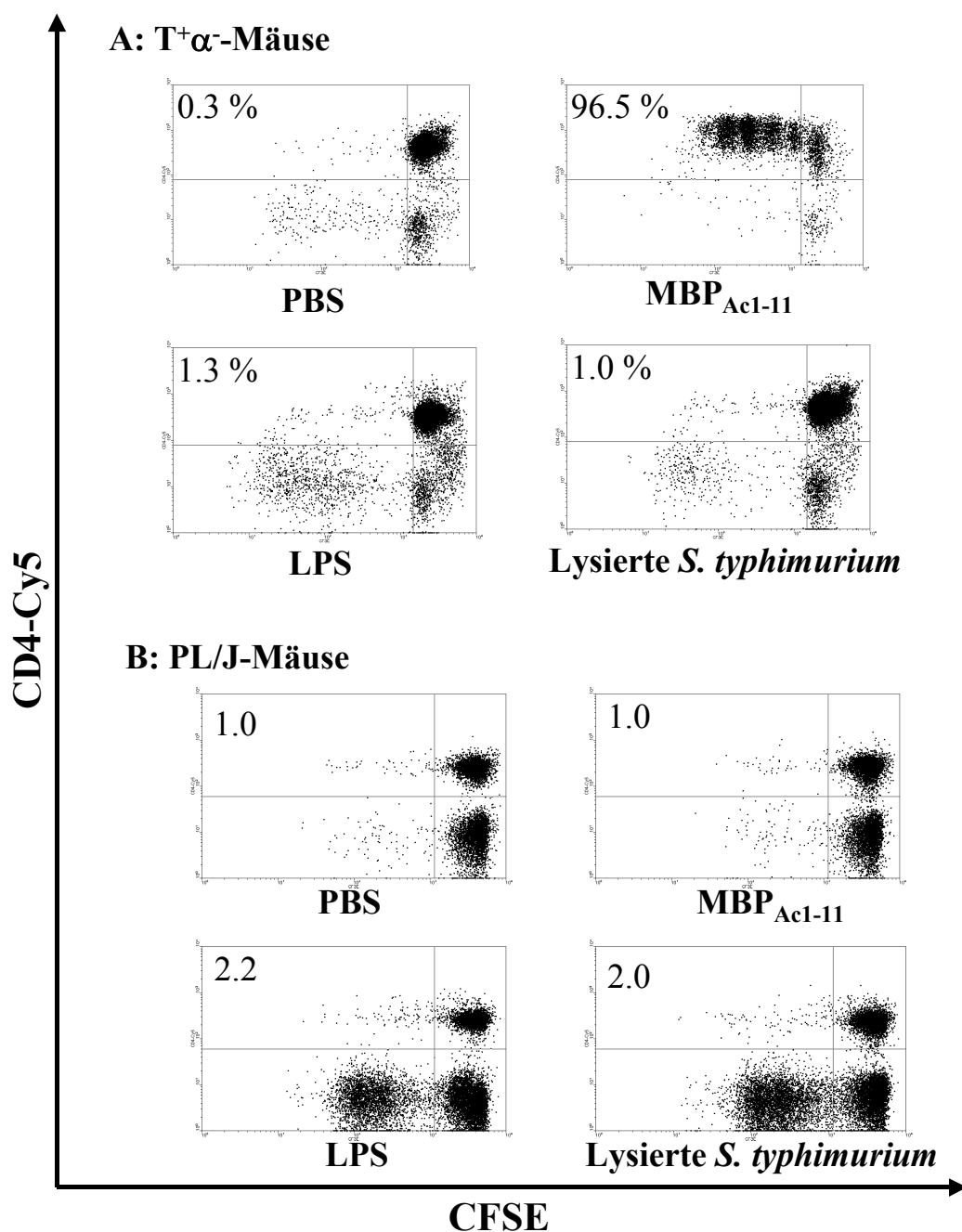


Abbildung 10 Geringe T-Zellproliferation nach LPS Stimulation. Milzzellen von T⁺α-Mäusen (**A**) und PL/J-Mäusen (**B**) wurden mit CFSE gefärbt und den angegebenen Substanzen stimuliert. PBS diente dabei als Negativkontrolle. Die Konzentrationen der verschiedenen Substanzen sind: LPS 2 µg/ml, 1x10⁶ /ml lysierte *S. typhimurium*, MBP 10 µg/ml. Nach 3 Tagen wurden die Zellen geblockt mit Rattenimmunglobulin und anti-Fcγ-Rezeptor, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Zellen wurden gefärbt mit anti-CD4-Cy5 und B220-PE. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurde Propidiumiodid zugegeben. B220+ und PI+ Zellen wurden bei der Analyse ausgegrenzt.

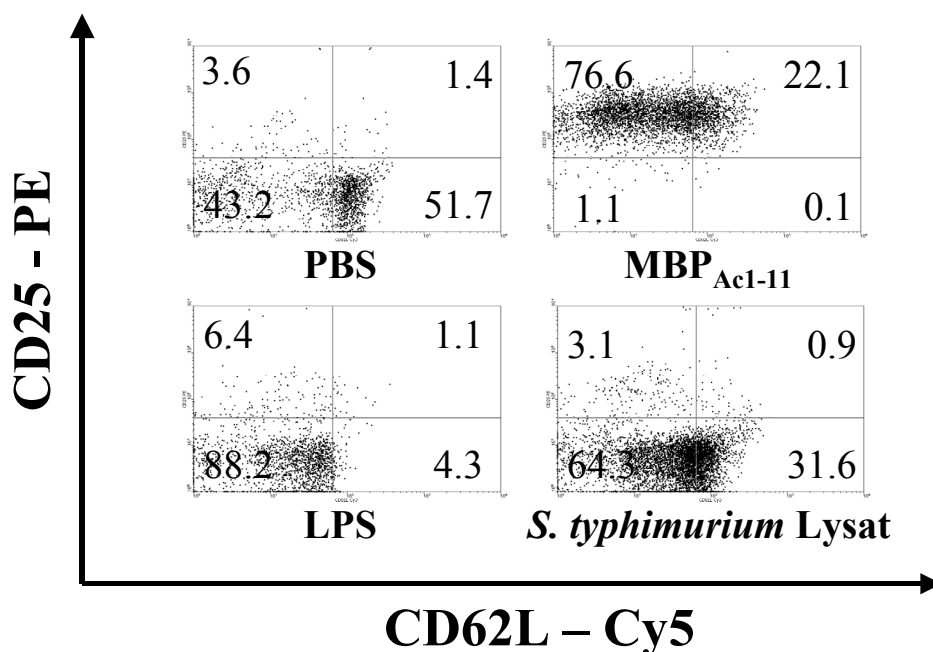


Abbildung 11 Beeinflussung der Expression von T-Zellaktivierungsmarkern durch LPS. Milzzellen von $T^+\alpha^-$ Mäusen wurden mit PBS, LPS (2 $\mu\text{g/ml}$), lysierten *S. typhimurium* (1×10^6), MBP (10 $\mu\text{g/ml}$) oder Peptid 383 (10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Zellen gewaschen und mit Rattenimmungobulin und anti-Fc γ -Rezeptor blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD4-biotin, anti-CD62L-Cy5 und anti-CD25L gefärbt. Nach 15 min Inkubation und einem Waschschrift wurde Streptavidin-PerCP als Sekundärfärbung zugegeben. Eine durchflusszytometrische Analyse wurde durchgeführt. Nur die $CD4^+$ Zellen sind angezeigt.

4.5.2.3 Die Abhängigkeit der Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen vom TCR

Eine wesentliche Frage ist die Möglichkeit einer vom T-Zellrezeptor unabhängigen Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen. Um dies zu untersuchen, muss der T-Zellrezeptor durch entsprechende Antikörper blockiert werden (vgl. S. 46).

Zur Hemmung der Aktivierung der T-Zellen durch den T-Zellrezeptor müssen Oberflächenmoleküle durch spezifische Antikörper blockiert werden. Wir verwendeten dazu klonotypische anti-TCR Antikörper (3H12) und CD4 (L3T4) Antikörper.

Die Ergebnisse der Blockade mit beiden Antikörpern waren ähnlich, gezeigt sind hier die Ergebnisse mit anti-CD4.

Die blockierenden Antikörper wurden nach Herstellung der Milzzellsuspension von $T^+\alpha^-$ - Mäusen den Zellkulturen zugegeben und während der Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Substanzen in der Suspension belassen.

Die Zugabe von PBS löste unabhängig von der Zugabe der Antikörper keine Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen aus (siehe Abbildung 12).

Auf der anderen Seite werden die Milzzellen bei Abwesenheit von Antikörpern durch MBP_{Ac1-11}-Peptid stark aktiviert. Das Vorhandensein von CD4 (bzw. 3H12)-Antikörper blockiert die Aktivierung durch das Peptid.

LPS kann, wie bereits in Abschnitt 4.5.2.2 gezeigt wurde, die Zellen unbehandelter Milzzellen in einen aktivierten Zustand (CD62L^{low}CD25^{high}) versetzen. Diese Aktivierung ist allerdings nicht so stark wie die Aktivierung der T-Zellen durch das MBP_{Ac1-11}-Peptid. Im Gegensatz zu diesem werden die Zellen durch LPS aber auch dann noch aktiviert, wenn der T-Zellrezeptor durch Antikörper blockiert ist (siehe Abbildung 12). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen unabhängig vom T-Zellrezeptor ist. Es müssen also andere Mechanismen dafür verantwortlich sein, die eine Aktivierung der T-Zellen hervorrufen. Da die Spezifität der T-Zellen durch den T-Zellrezeptor gewährleistet ist, ist die Aktivierung der T-Zellen durch LPS definitionsgemäß eine antigenunabhängige Aktivierung.

4.5.2.4 In vitro Effekte in nicht-transgenen Mäusen

Um auszuschließen, dass sich der beobachtete Effekt von LPS auf CD4⁺ T-Zellen nur auf die transgenen T⁺α⁻ Mäuse beschränkt, untersuchten wir Milzzellen von PL/J Mäusen. Diese Mäuse verfügen über ein normales T-Zellrepertoire und sind auch sonst in keiner Weise genetisch verändert. Solche Mäuse werden Wildtypmäuse genannt. Milzen von diesen Mäusen wurden entnommen und präpariert (siehe Abschnitt 3.2.1.2). Nach 3 Tagen Kultur mit verschiedenen Substanzen wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass in diesen Mäusen LPS einen Effekt ähnlich wie bei den T⁺α⁻ Mäusen auf die CD4⁺-T-Zellen ausübt (siehe Abbildung 13) und dass es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um ein Artefakt durch den transgenen Phänotyp der T⁺α⁻ Mäuse handelt.

Das Peptid MBP_{Ac1-11} sowie die Peptide 383 und 378 hatten in den PL/J-Mäusen erwartungsgemäß keinen Effekt, da die spezifischen T-Zellen ohne vorheriger Immunisierung in so geringer Zahl vorhanden sein sollten, dass deren Aktivierung nicht messbar ist. Allerdings ist damit nicht gezeigt, dass die Aktivierung von T-Zellen durch LPS auch in Wildtypmäusen eine Relevanz besitzt und durch ihn Autoimmunität hervorgerufen werden kann. Es ist möglich und meines Erachtens wahrscheinlich, dass sich dies auf die transgenen Mäuse beschränkt, weil hier die autoreaktiven T-Zellen eine besonders hohe Frequenz haben.

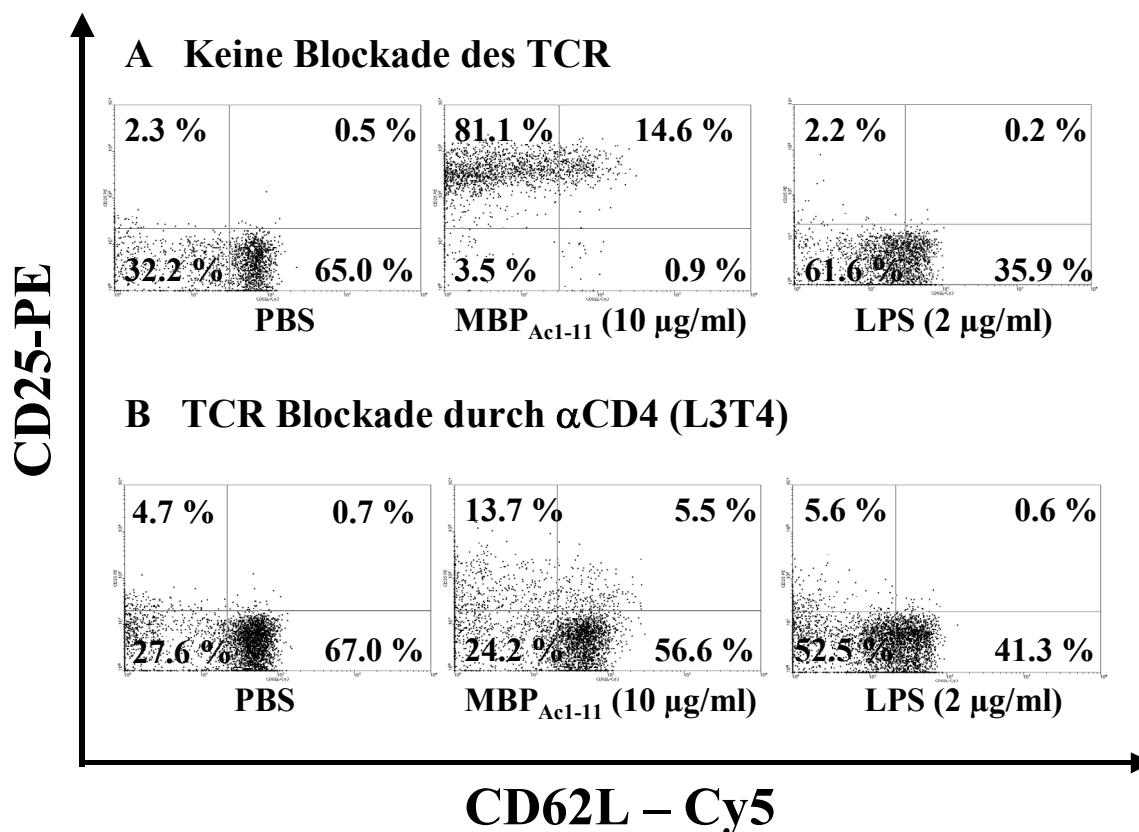


Abbildung 12 Blockade von CD4 verhindert Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen durch Peptide, aber nicht durch LPS. Milzzellen von T⁺ α ⁻ Mäusen wurden in Suspension gebracht und entweder direkt in Kultur gebracht (A), oder die T-Zellrezeptoren wurden mit dem anti-CD4-Antikörper L3T4 blockiert (B). Anschließend wurden die Zellen mit PBS, MBP_{Ac1-11} (10 µg/ml) oder mit LPS (2 µg/ml) stimuliert. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen resuspendiert. Nach Zugabe von anti-Fc γ -Rezeptor und Ratten IgG wurden die Zellen mit anti-MHC-II-FITC, anti-CD25-PE, CD4-biotin und CD62L-Cy5 gefärbt. Eine Sekundärfärbung mit Streptavidin-PerCP wurde durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Nur T-Helfer-Zellen (CD4⁺MHC-II⁻ Zellen der richtigen Größe und Granularität) sind dargestellt.

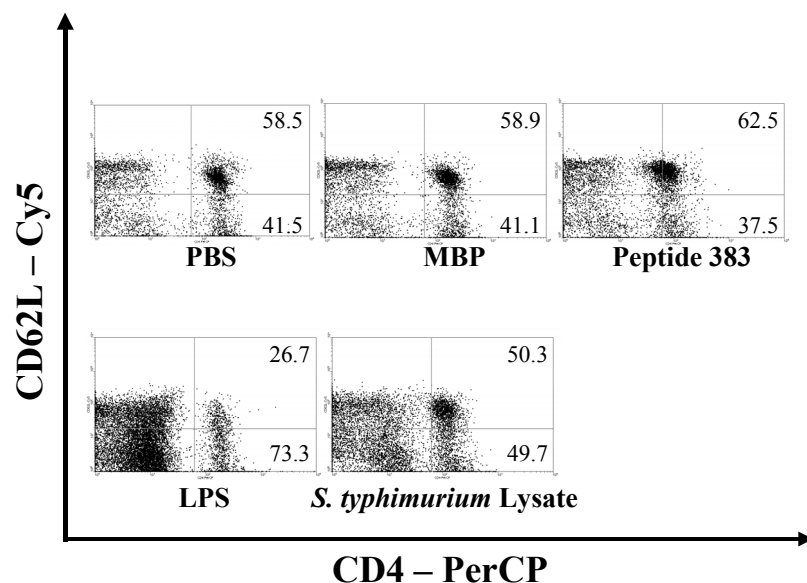


Abbildung 13 *In vitro* Effekt von LPS auf T-Zellaktivierung in PL/J Mäusen. PL/J Mäusen wurden die Milzen entnommen und eine Zellsuspension wurde hergestellt. Die Zellen wurden mit den angegebenen Substanzen stimuliert (MBP und Peptid 383: 10 µg/ml, LPS: 2 µg/ml, *S. typhimurium* Lysat: 1×10^6 Bakterien/ml). Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen gewaschen, geblockt und mit anti-CD62L-Cy5, und anti-CD4-biotin gefärbt. Anschließend wurde als Sekundärfarbstoff Streptavidin-PerCP zugegeben. Eine durchflusszytometrische Analyse wurde durchgeführt.

4.5.3 *In vivo* Antwort der T-Zellen auf LPS und bakterielle Lysate

Bei diesen geringen T-Zellproliferationen muss untersucht werden, ob es sich um ein physiologisch relevantes Phänomen handeln. Um dies zu überprüfen, ist es nötig, den Effekt von LPS und den bakteriellen Lysaten *in vivo* experimentell zu untersuchen.

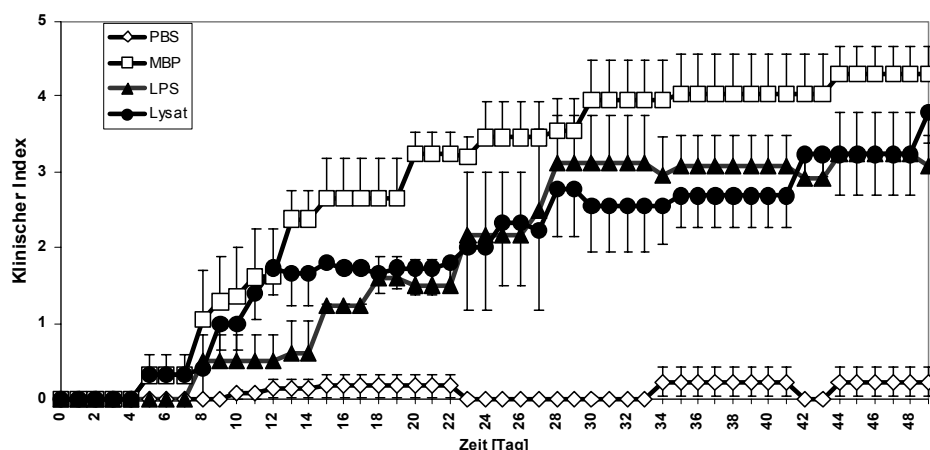
Dazu wurden $T^+\alpha^-$ -Mäuse mit LPS (50 µg/Maus) oder Lysate (1×10^8 lysierte Bakterien/Maus), in Kompletten Freund's Adjuvant emulgiert, subkutan injiziert. 24 und 48 Stunden später wurde Pertussistoxin (200 ng/Maus) intravenös appliziert.

Als Kontrolle wurden andere Gruppen von $T^+\alpha^-$ -Mäusen mit PBS als Negativkontrolle und MBP_{Ac1-11}-Peptid oder dem Peptid 383 als Positivkontrolle immunisiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 gezeigt.

Es wird deutlich, dass auch LPS und das bakterielle Lysat *in vivo* die

Autoimmunkrankheit EAE in $T^+\alpha^-$ Mäusen hervorrufen kann. Dass die Mäuse nicht bei jeder Form der Immunisierung krank werden, ist durch die Negativkontrolle gezeigt, denn hier werden die Mäuse auch mit den immunstimulatorisch wirkenden Adjuvantien Kompletten Freund's Adjuvant und Pertussistoxin immunisiert.



Mäuse	Substanz	Anzahl Mäuse	Inzidenz	Mittlerer Beginn (Tage)	Spanne	Mittlerer Index*	Spanne
$T^+ \alpha^-$	MBP _{Ac1-11}	17	16/17	13	4-24	5	2-5
$T^+ \alpha^-$	LPS	15	13/15	21	8-35	3	1-5
$T^+ \alpha^-$	Lysierte <i>S. typhimurium</i>	15	13/15	15	4-49	5	2-5
$T^+ \alpha^-$	PBS	15	4/15	15	10-34	1	1-2
α^-	LPS	10	0/10	—	—	0	0
PL/J	LPS	10	0/10	—	—	0	0

* Mittlerer Index von erkrankten Tieren

Abbildung 14: Induktion von EAE durch LPS. $T^+ \alpha^-$ Mäuse wurden mit LPS (50 µg/Maus), MBP_{Ac1-11} (200 µg/Maus), lysierten *S. typhimurium* (1×10^8 /Maus) oder PBS (100 µl/Maus) immunisiert. Alle Lösungen wurden vor Applikation in kompletten Freund's Adjuvant emulgiert und anschließend subkutan in die Schwanzbasis injiziert. 200 ng Pertussis Toxin wurden 24 und 48 Stunden später intravenös gegeben. Klinischer Index (siehe auch Seite 47): 0 – Maus gesund; 1 – Schwanz gelähmt; 2 – Teilweise Paraparese der Hinterläufe; 3 – Vollständige Paralyse der Hinterläufe; 4 – Paralyse der Hinter- und Vorderläufe; 5 – Tod. Bei einem Index von 4 wurden die Mäuse getötet und für den Rest des Experiments als Index 5 gewertet.

4.5.4 Histologien LPS- und MBP –immunisierter Mäuse

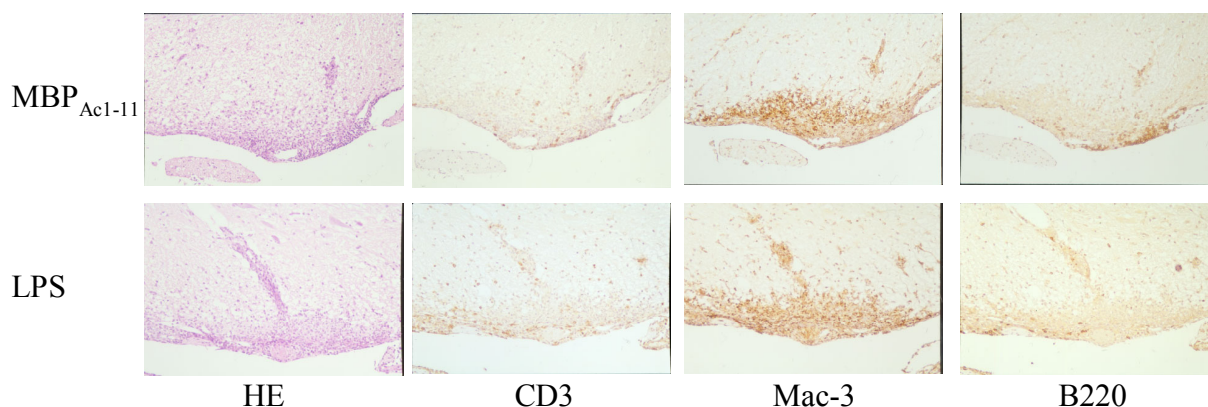


Abbildung 15 Histologien von an EAE erkrankten Mäusen. $T^+ \alpha^-$ Mäuse wurden mit LPS (50 µg/Maus) oder MBP_{Ac1-11} (200 µg/Maus) immunisiert. Alle Lösungen wurden vor Applikation in komplettem Freund's Adjuvant emulgiert und anschließend subkutan in die Schwanzbasis injiziert. 200 ng Pertussis Toxin wurden 24 und 48 Stunden später intravenös gegeben. Bei einem klinischen Index von 3 wurden die Mäuse perfundiert und histologisch aufgearbeitet. Es sind mit HE, CD3, Mac-3 und B220 gefärbte Schnitte gezeigt. Die Infiltrate scheinen bei beiden Immunisierungen gleich aufgebaut zu sein. Auch bei mit *S. typhimurium*-Lysat immunisierte Mäusen zeigte sich kein Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Von anderen Gruppen wurde beschrieben, dass sich das histologische Erscheinungsbild der Krankheit EAE unterschiedlich darstellen kann, wenn andere Bedingungen geschaffen werden. Speziell zeigte Dr. J. Lafaille, dass Th2-Zellen in Mäusen Infiltrate erzeugen, in denen polymorphkernige Granulozyten und Mastzellen vorherrschen, im Gegensatz zu dem Vorherrschen von Makrophagen in Infiltraten hervorgerufen von Th1-Zellen[114].

Eine wichtige Frage ist also, ob die Histologien der Infiltrate von Mäusen, nachdem sie mit LPS immunisiert wurden, sich von den Histologien der mit Peptid immunisierten Mäuse unterscheidet.

Um dies zu untersuchen, wurden Gehirne und Rückenmark von erkrankten Mäusen bei einem klinischen Index von 3 nach verschiedenen Immunisierungen entnommen, histologisch aufbereitet und untersucht (siehe Abschnitt 3.2.3). Die Untersuchung beinhaltet die Beschreibung der Infiltrate betreffs Zusammensetzung und Lokalisation. Außerdem wird korrespondierend zu dem klinischen Index ein histologischer Index ermittelt. Dieser ist gleich der durchschnittlichen Anzahl von Infiltraten pro Rückenmarksquerschnitt.

Die Auswertung der Histologien nahm Dr. C. Stadelmann, damals Instituts für Neuropathologie der Charité, vor.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, konnten keine Unterschiede zwischen Infiltraten von mit LPS- oder MBP-Peptid immunisierten Mäusen festgestellt werden. Auch der histologische Index unterschied sich nicht. Bei den Infiltraten und Indizes von Mäusen, die mit *S. typhimurium*-Lysat immunisiert wurden, wurden keine Unterschiede festgestellt, die Histologien sind aber nicht gezeigt.

Bei den Infiltraten herrschen Mac-3-positive Zellen, also Makrophagen, vor. Einige CD3-positive (T-Zellen) und einige B220-positive (B-Zellen) Zellen kommen vor.

Die Ergebnisse für mit Peptid immunisierte Mäuse decken sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten (Seite 23), die Ergebnisse für mit LPS immunisierten Mäuse lassen keinen Unterschied erkennen.

4.5.5 T-Zellabhängige Induktion von EAE durch LPS

Durch die vorhergehenden Experimente ist zwar gezeigt, dass LPS einen *in vitro* Effekt auf T-Zellen hat und dass LPS in $T^+\alpha^-$ -Mäusen EAE auslösen kann. Allerdings könnte

es auch sein, dass EAE unabhängig von T-Zellen induziert wird, sondern durch Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems.

Um dies zu untersuchen, wurden $\alpha^{-/-}$ -Mäuse mit LPS oder bakteriellen Lysaten immunisiert. Diese Mäuse stammen aus derselben Zucht wie die $T^+\alpha^{-}$ -Mäuse. Da der transgene T-Zellrezeptor in manchen Mäusen heterozygot vorhanden ist, werden bei der Zucht gelegentlich Mäuse geboren, die den transgenen T-Zellrezeptor nicht vererbt bekommen haben. Diese Mäuse werden durch Bluttestung auf $CD4^+ V\beta 8^+$ -Zellen ermittelt und in einer gesonderten Zucht verpaart. Diese Mäuse besitzen keine T-Zellen, da durch das Ausschalten der T-Zellrezeptor α -Ketten kein funktioneller T-Zellrezeptor gebildet werden kann.

Diese Mäuse wurden wie oben beschrieben LPS in Adjuvant und mit Pertussistoxin i.v. immunisiert. Trotz mehrfacher Wiederholung der Experimente (insgesamt wurden 20 Mäuse immunisiert), wurde bei keiner Maus das Entstehen von EAE beobachtet. Dies zeigt, dass T-Zellen zur Induktion von EAE durch LPS nötig sind.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen mikrobiellen Infektionen und Autoimmunkrankheiten untersucht. Die Hypothesen der molekularen Mimikry und der „Bystander-Aktivierung“ wurden an einem Mausmodell für die Autoimmunkrankheit experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) überprüft.

5.1 Aussagen über Molekulare Mimikry

5.1.1 Aussagen über die Spezifität des T-Zellrezeptors

In dieser Arbeit wurden Experimente zur Untersuchung der Spezifität eines I-A^u/MBP_{Ac1-11} spezifischen, murinen T-Zellrezeptors durchgeführt. Der Spezifität eines T-Zellrezeptors wird aufgrund der Schlüsselrolle der CD4⁺ T-Zellen im Immunsystem eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von spezifischer Immunität gegen Bakterien einerseits, auf der anderen Seite aber auch bei der Induktion von Autoimmunität durch das Erkennen von Selbstpeptiden, zugeschrieben.

Wie in Abschnitt 4.3 dargestellt, fanden wir viele Peptide viralen und bakteriellen Ursprungs, welche *in vitro* die I-A^u/MBP_{Ac1-11} spezifischen T-Zellen zur Proliferation anregen und somit aktivieren. Bei näherer Untersuchung einiger dieser Peptide (siehe Abschnitt 4.4) zeigte sich, dass sich die Dosis-Wirkungskurven und die durch die Peptide induzierte Zytokinexpression sich nicht von der durch das Selbstpeptid MBP_{Ac1-11} induzierten Aktivierung unterschied. Des weiteren waren sowohl das Selbstpeptid MBP_{Ac1-11} als auch die Peptide mikrobiellen Ursprungs in der Lage, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in den von uns verwendeten transgenen T⁺α⁻-Mäusen auszulösen. Auch hier war kein Unterschied im Schweregrad oder im Verlauf der induzierten Krankheit festzustellen. Somit ist erstens Autoimmunität über Kreuzreaktivität auslösbar, zweitens kommen sehr viele mikrobielle oder virale Peptide vor, die mit Selbstpeptiden an einem T-Zellrezeptor kreuzreagieren.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht die Frage beantwortet werden, ob die kreuzreaktiven Peptide auch *in vivo* aus den Proteinen prozessiert werden oder ob die Proteine in einer Konzentration vorkommen, welche ausreicht, um eine suffiziente T-Zellaktivierung hervorzurufen. Ein Versuch zur Beantwortung dieser Frage wurde von uns durch die Untersuchung der Lysate von *S. typhimurium* unternommen. Allerdings war die Proliferation der Th-Zellen auf das Lysat nur sehr gering und wurde auch durch LPS ausgelöst. Dementsprechend kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob

Lysate die Th-Zellen ausschließlich durch LPS oder auch durch kreuzreaktive Peptide aktivieren.

Einen Hinweis darauf, dass es Kreuzreaktivität zwischen Peptiden gibt, die *in vivo* prozessiert werden und in der nötigen Konzentration vorkommen, ohne dass diese Kreuzreaktivität eine beobachtbare Rolle spielt, verdeutlichte ein Ergebnis von Maier et al. in unserer Gruppe[61]: Für die Experimente wurden Mäuse verwendet, die transgen für humanes HLA-DR4 und humanes CD4 waren, wobei die endogenen MHC-II-Moleküle der Mäuse ausgeschaltet wurden. Aus diesen Mäusen wurden T-Zellklone generiert, die spezifisch für Peptide des OspA-Protein von *Borrelia burgdorferii* in Verbindung mit dem HLA-DR4⁺-Molekül sind.

T-Zellen solcher Spezifität sind möglicherweise an der Pathogenese der therapieresistenten Verlaufsform der Lyme-Arthritis beteiligt.

Diese T-Zellhybridome wurden auf Kreuzreaktivität mit Selbstpeptiden untersucht.

Interessanterweise fanden sich unter anderem Kreuzreaktivitäten zwischen dem OspA-Peptid und dem Vorläuferprotein des Insulins. Dabei war das Peptid des Proinsulins genau ein solches Epitop, welches auch bei HLA-DR4⁺ Diabetespatienten immundominant ist. Dies zeigt, dass dieses Peptid tatsächlich *in vivo* vorkommt und prozessiert wird. Dennoch ist eine Assoziation zwischen Lyme-Borreliose und Diabetes mellitus Typ I nicht beobachtet worden.

Sowohl die Ergebnisse von Maier et al. als auch unsere Ergebnisse fanden also multiple kreuzreaktive Peptide in zwei unterschiedlichen Systemen, wobei beide Methoden das Ausmaß der Kreuzreaktivität noch unterschätzen dürften. Doch selbst bei der Untersuchung dieser Peptide wurden kreuzreaktive Peptide gefunden, die *in vivo* prozessiert werden. Unter physiologischen Bedingungen kommen Tausende von unterschiedlichen T-Zellen vor, und es ist, auch nach Ergebnissen anderer Gruppen[59,60,61,113,115,116,117], davon auszugehen, dass jeder T-Zellrezeptor eine Vielzahl von Peptiden erkennt.

Kreuzreaktivität ist somit ein sehr häufig vorkommendes Ereignis.

Als zusätzliches Ergebnis der Arbeit ist die wichtige Aussage festzuhalten, dass es bei der Suche nach mikrobiellen Peptiden, die autoaggressive T-Zellen aktivieren können, nicht ausreicht, homologe Peptide, also Peptide gleicher oder ähnlicher Sequenz, zu bestimmen. In dieser Arbeit wurden beispielsweise 5 kreuzreaktive Peptide gefunden, die eine dem MBP_{Ac1-11}-Peptid vergleichbare Proliferation hervorrufen und nur an 2 Positionen identische Aminosäuren wie das MBP_{Ac1-11}-Peptid besitzen. Eine Suche

nach homologen Peptiden würde demnach nur eine geringe Anzahl der Peptide finden, die tatsächlich kreuzreaktiv sind.

Auch eine Suche nach Peptiden, die strukturelle Ähnlichkeiten zu dem Ausgangspeptid besitzen, würde das Ausmaß der Kreuzreaktivität unterschätzen. Beispielsweise sind an Position 3 des von uns verwendeten Supertops die Aminosäuren Phenylalanin, Histidin, Methionin und Glutamin substituierbar, ohne dass die T-Zellaktivierung beeinträchtigt wird. So ist zwar sowohl die Seitenkette des Ausgangspeptids Glutamin als auch von Methionin unverzweigt, unpolar und relativ lang. Wird die Seitenkette des Glutamins nur um eine Methylgruppe verkürzt, also Asparagin substituiert, geht die T-Zellaktivierung verloren.

Auf der anderen Seite besteht keine offensichtliche Ähnlichkeit zwischen diesen Aminosäuren und den Aminosäuren Phenylalanin und Histidin, die eine aromatische Seitenkette besitzen. Fügt man an das Phenylalanin nur eine –OH-Gruppe, substituiert also Tyrosin, geht die T-Zellaktivierung sehr stark zurück.

Wenn man bei einer Suche nach strukturellen Ähnlichkeiten an Position 3 nur Methionin und Glutamin als Aminosäuren mit langen, unpolaren Seitenketten gelten lässt, wären nur 39 Peptide statt der 61 kreuzreaktiven Peptide gefunden worden. Allein hier hätte man die Kreuzreaktivität um ein Drittel unterschätzt.

Außerdem ist festzuhalten, dass es auch nicht genügt, Peptide zu finden, die besonders gut an MHC-Moleküle binden[118]. Die von uns untersuchte T-Zellrezeptor/MBP_{Ac1-11}/I-A^u-Bindung ist im Gegenteil dadurch gekennzeichnet, dass sie besonders kurzlebig und die Affinität des T-Zellrezeptors an den MBP_{Ac1-11}/I-A^u-Komplex eher schwach ist[110,111,119]. So konnte Position 4, also neben Position 5 die zweite Bindungsstelle an das MHC-Molekül, durch jede natürlich vorkommende Aminosäure ersetzt werden, ohne dass die T-Zellaktivierung beeinträchtigt wurde.

Es wurde sogar diskutiert, dass in diesem Modell die kurze Bindungszeit benötigt wird, um das Peptid immunogen zu halten und eine Toleranzinduktion zu verhindern[120].

Da es keine verwendbaren mathematischen Modelle zur Vorhersage von Kreuzreaktivität gibt, muss also zur Bestimmung kreuzreaktiver Peptide eine systematische Definition des Supertops und anschließende Überprüfung der Peptide durchgeführt werden, wie dies in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

5.1.2 Konsequenzen für das Verständnis der T-Zellrezeptor-Antigen-Erkennung

Inwieweit betreffen diese Ergebnisse die Vorstellungen über die Antigenerkennung durch T-Zellen? Wie oben bereits beschrieben, kommt dem T-Zellrezeptor eine Schlüsselrolle durch die Bindung an MHC/Antigen-Komplexe zu (siehe Seite 12 ff.). Wenn Kreuzreaktivität ein häufig vorkommendes Ereignis ist und somit die enge Spezifität der T-Zellrezeptoren nicht mehr gewährleistet ist, können die jetzigen Konzepte zur T-Zellrezeptor/Antigen-Erkennung noch beibehalten werden?

Um diese Frage zu diskutieren, soll noch einmal festgehalten werden, dass in dieser Arbeit zwar festgestellt wurde, dass die Spezifität der T-Zellen geringer ist als in klassischen Modellen postuliert, aber dennoch nicht jedes Peptid durch jeden T-Zellrezeptor erkannt wird. Vielmehr ist es so, dass jeder T-Zellrezeptor eine bestimmte Gruppe von Peptiden erkennt, welche sich durch manche strukturelle Gemeinsamkeiten ähneln. Somit ist ein T-Zellrezeptor schon spezifisch, wenn auch nicht für nur ein einziges Peptid.

Des weiteren ist zu sagen, dass in dieser Arbeit, aufgrund des gewählten Tiermodells, Kreuzreaktivität als negatives Ereignis, nämlich dem Entstehen von Autoimmunität, gesehen wurde.

Allerdings wird diskutiert, dass unter physiologischen Bedingungen Kreuzreaktivität zwischen Selbst- und Fremdpeptiden benötigt wird, um nach einer Infektion die entstandenen Gedächtnis-T-Zellen durch ständige, suboptimale Stimulation der T-Zellen in einem funktionsfähigem Zustand zu halten[121,122]. Naive T-Zellen würden durch eine solche suboptimale Stimulation eventuell nicht aktiviert werden, da sie eine stärkere T-Zellrezeptor-Antigen-Bindung benötigen, um aktiviert zu werden[123,124].

5.1.3 Hypothetisches Konzept zum Verständnis des Immunsystems bei eingeschränkter Spezifität des T-Zellrezeptors

Für einen weiteren, sehr interessanten Beitrag, zur Diskussion der Relevanz der T-Zellrezeptor-Antigen-Bindung bei eingeschränkter Spezifität der T-Zellrezeptoren halte ich die Arbeit von Mason[125], in welcher postuliert wird, dass ohne Kreuzreaktivität eine suffiziente T-Zellantwort nicht möglich wäre, da, wenn jede T-Zelle nur ein Peptid erkennen würde, die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fremdpeptid von einer T-Zelle erkannt würde, sehr gering wäre, da die Frequenz der für dieses Fremdprotein spezifischen T-Zellen sehr gering wäre. Demnach würden Infektionen nicht oder nur

sehr spät erkannt und die Antwort entsprechend schwach sein, die Immunantwort wäre insuffizient.

Ich vermute, dass man in Erweiterung dieser Spekulation auch eine physiologische Immunantwort verstehen kann:

Im Thymus werden T-Zellen depletiert, die zu stark durch Selbstpeptide aktiviert werden. Unter Bedingungen ohne eine Infektion würden naive T-Zellen demnach nicht aktiviert.

Wird ein Individuum von einem Fremdorganismus infiziert, enthält dieser Organismus nicht nur ein, sondern sehr viele Fremdpeptide. Außerdem würden durch immunstimulatorische Substanzen wie LPS oder CpG oder auch durch Gewebeuntergang kostimulatorische Moleküle an den antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Es würden also sehr viele verschiedene T-Zellen auf einmal aktiviert und durch die Peripherie zirkulieren. Tritt eine Infektion mit demselben Fremdorganismus an einer anderen Stelle im Körper auf, würden also wiederum sehr viele T-Zellen gleichzeitig durch diesen Krankheitserreger stimuliert werden und eine Immunantwort hervorrufen.

Da unter physiologischen Bedingungen diese T-Zellantwort eben gerade sehr divers ist, erkennt jede der aktivierten T-Zellen zwar Peptide des Fremdorganismus, jedoch sind die Selbstpeptide, durch welche die T-Zellen aktiviert werden, in unterschiedlichen Geweben lokalisiert. Des weiteren werden in diesen Geweben keine kostimulatorischen Moleküle exprimiert, da dort vermutlich keine Infektion vorliegt. Die T-Zellen, die also in solchen Geweben durch Selbstpeptide aktiviert würden, würden zwar kurzzeitig eine geringgradige Inflammation und eventuell eine geringe Zellzerstörung kommen. Da in diesen Geweben aber nur sehr wenige T-Zellen aktiviert würden, würde die Frequenz der T-Zellen nicht ausreichen, um eine andauernde Inflammation hervorzurufen.

Insbesondere würden solche T-Zellen durch immunsuppressive Gegenregulation, also zum Beispiel durch regulatorische T-Zellen oder durch bestimmte Oberflächenmoleküle, an der Induktion einer suffizienten Inflammation gehindert. Schließlich würden die T-Zellen entweder durch solche Mechanismen oder durch aktivierungsinduzierten Zelltod in Apoptose übergehen.

Gewebe, die besonders empfindlich für Gewebeerstörung sind, insbesondere das ZNS, sind durch die in Abschnitt 1.5.2 beschriebenen Schranken vor unkontrolliertem Eindringen von T-Zellen geschützt.

Während einer unkomplizierten Infektionen in der Peripherie käme es also eventuell zu Gewebsuntergängen in verschiedenen Organen aufgrund von Kreuzreaktivität, solange die Organe nicht durch spezielle Schranken geschützt sind. Die entstandenen Schäden wären aber in diesem hypothetischen Modell nicht gravierend und könnten vom Individuum regeneriert werden, solange die selbstreagierenden T-Zellen einen gewissen Grenzwert nicht überschreiten und eine Inflammation nicht selbstständig auslösen können.

Gesetzt den Fall, es kommt zu einer Infektion in einem besonders empfindlichen Organ oder eine T-Zelle erkennt ein Selbstpeptid in dem durch den Fremdorganismus entzündeten Gewebe. Bei dem Ausmaß der Kreuzreaktivität, wie sie in dieser Arbeit gefunden wurde, wäre dies wahrscheinlich ein häufig vorkommendes Ereignis.

Die Frage ist, ob es in einem solchen Fall zu Autoimmunität käme: Es würden zur selben Zeit sehr viele T-Zellen aktiviert, des weiteren würden kostimulatorische Moleküle exprimiert.

In einem solchen Fall sollten solche T-Zellen tatsächlich durch Selbstpeptide aktiviert werden. Wesentlich ist aber, dass bei einem Rückgang der Inflammation die anderen T-Zellen verschwinden würden. Da während der Inflammation durch Fremdpeptide aktivierte T-Zellen ebenso proliferierten wie die autoreaktiven Zellen, sollte die Frequenz der autoreaktiven T-Zellen gering sein im Vergleich zu den vielen verschiedenen T-Zellen, die durch Selbstpeptide dieses Gewebes nicht aktiviert werden. Bei einem Rückgang der Inflammation genügten die selbstreaktiven T-Zellen deswegen wahrscheinlich nicht, um alleine eine Inflammation aufrechtzuerhalten, insbesondere, da auch die immunstimulierenden Substanzen des Fremdorganismus fehlen. Diese T-Zellen sollten dementsprechend durch aktivierungsinduziertem Zelltod in Apoptose übergehen.

Es soll noch einmal wiederholt werden, dass oben beschriebenes Konzept hypothetisch ist und mit dieser Arbeit nicht bewiesen werden kann. Eine Schwierigkeit, diese Hypothese zu belegen, ist, dass sämtliche Modelle, welche Kreuzreaktivitäten untersuchen, eine artifiziell hohe Anzahl von T-Zellen einer Spezifität aufweisen, da unter physiologischen Bedingungen die Frequenzen eines bestimmten T-Zellrezeptors exprimierender T-Zellen zu gering sind, um diese zu untersuchen.

Nach obiger Hypothese käme es mit solchen Modellen auch besonders häufig zu Autoimmunität, da die artifiziell hohe Frequenz dieser T-Zellen einer Spezifität eventuell

ausreichen, eine Inflammation aufrechtzuerhalten, was unter physiologischen Bedingungen nicht vorkäme.

5.1.4 Molekulare Mimikry – Auslöser für Autoimmunität?

Es bleibt zu diskutieren, ob molekulare Mimikry als Auslöser von Autoimmunkrankheiten in Frage kommt oder nicht.

Nach den Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten[59,60,61,113,115,116,117] ist Kreuzreaktivität ein sehr häufig vorkommendes Ereignis. Deswegen reicht in den allermeisten Fällen Kreuzreaktivität nicht aus, um Autoimmunität auszulösen, wenn nicht noch andere Faktoren hinzukommen (siehe auch Abschnitt 5.3).

Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht doch ein Fremdorganismus vorkommt, der über Kreuzreaktivität eine Autoimmunerkrankung auslösen kann. Nach der im vorigen Abschnitt vorgeschlagenen Hypothese können mit einiger Vorsicht Voraussagen getroffen werden, wie ein Organismus beschaffen sein könnte, dass die Wahrscheinlichkeit zur Induktion von Autoimmunität durch molekulares Mimikry höher ist:

Eine Möglichkeit wäre, dass der hypothetische Fremdorganismus nur sehr wenig Fremdproteine enthält. Da eine T-Zellantwort somit auf nur wenige T-Zellklone beschränkt bliebe, würde die Frequenz einer T-Zellpopulation einer Spezifität stark ansteigen. Somit wäre die Wahrscheinlichkeit, dass die expandierenden T-Zellen im gesunden Gewebe selbstständig Inflammation auslösen können, besonders hoch. Einem solchen hypothetischen Krankheitserreger entsprächen Viren am ehesten, da sie besonders wenige Proteine enthalten und bei viralen Infekten nur wenige Peptide immundominant sind.

Eine zweite Möglichkeit wäre, dass ein Fremdorganismus an sehr vielen T-Zellepitopen kreuzreaktiv zu Peptiden in einem bestimmten Organ ist. Wenn viele verschiedene T-Zellen Selbstpeptide in diesem Organ erkannten, reichten diese T-Zellen eventuell aus, um auch Inflammation in diesem Organ hervorzurufen und zu unterhalten. Ein solches Prinzip könnte sowohl in Bakterien, Parasiten oder in Viren vorkommen. Es muss jedoch betont werden, dass zu beiden Möglichkeiten noch keine detaillierten Studien unternommen wurden.

Untersuchungen, dass durch molekulare Mimikry Autoimmunität induzierbar ist, sollten dementsprechend immer sehr sorgfältig durchgeführt werden, und es sollte mehr

verlangt werden, als der ausschließliche Nachweis einer trivialen Kreuzreaktivität auf Peptid-Ebene.

Veröffentlichungen, die untersuchen, ob in einem Fremdantigen und einem Selbstantigen Kreuzreaktivität vorkommt, wenn ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen einer bestimmten Infektion oder einem Nahrungsbestandteil und einer bestimmten Erkrankung vermutet wird, sind demnach eher kritisch zu betrachten[62,126].

5.1.5 Methoden zur Definition eines Supertops

Ein Ziel der Arbeit war, mikrobielle Peptide zu finden, welche die transgenen T-Zellen aktivieren können. Es wurde das Prinzip der Substitutionsanalyse verwendet. Diese beruht darauf, durch Veränderungen des Selbstpeptids an jeweils einer Aminosäure herauszufinden, welche Änderungen eine Aktivierung der T-Zellen hervorrufen können. Die erlaubten Aminosäuresubstitutionen wurden in einem Motiv, dem Supertop, zusammengefasst.

Eine solche Supertopanalyse hat den Vorteil, dass man eine größere Menge mikrobieller Peptide findet und somit das Ausmaß von Kreuzreaktivität nicht unterschätzt. Außerdem wird eine systematische, vorurteilsfreie Definition des Supertops vorgenommen.

In anderen Arbeiten wurde jede Position des bekannten Peptids ausschließlich gegen Alanin oder gegen bestimmte Peptide ersetzt und untersucht, welche Position somit nicht essentiell für die Aktivierung der T-Zellen sind[59,64]. Diese Methoden haben aber den Nachteil, dass es möglich ist, dass an der untersuchten Position eventuell Alanin „erlaubt“ ist, aber andere Aminosäuren an dieser Position keine Aktivierung zulassen. Umgekehrt könnte es sein, dass Alanin keine Aktivierung hervorruft, dafür aber Aminosäuren, die beispielsweise eine andere Polarität besitzen. Das entstehende Motiv wäre also ungenau.

Auf eine andere, sehr interessante Variante soll im folgenden näher eingegangen werden, da sie in gewissem Sinne komplementär zu der von uns verwendeten ist und sich beide Vorgehensweisen ergänzen:

In der von Hemmer und Martin[60] entwickelten Methode werden nicht einzelne Aminosäuren des bekannten Peptids verändert, sondern es wird genau eine Aminosäure unverändert gelassen. Alle anderen Positionen werden zufällige Aminosäuren gebunden, so dass man eine Mischung von vielen Millionen

verschiedenen Peptiden in einer Probe erhält, die sich nur an einer Position gleichen. An jeder Position wird jetzt jede natürlich vorkommende Aminosäure unverändert gelassen. Bei einer theoretischen Länge des bekannten Peptids von 10 Aminosäuren würde man also $10 \text{ Aminosäuren} \times 20 \text{ natürlich vorkommende Aminosäuren} = 200$ Proben erhalten.

Diese Proben werden *in vitro* zu den zu untersuchenden Zellkulturen gegeben. Die Aktivierung der Zellen wird gemessen, und es wird ermittelt, welche Aminosäure an welcher Stelle möglich ist.

Der Vorteil dieser im Vergleich zu der von uns verwendeten Methode ist, dass Aminosäuresubstitutionen an einer Position, die keine Aktivierung der T-Zellen hervorrufen, durch eine Aminosäuresubstitution an einer anderen Stelle eventuell wieder ausgeglichen werden könnten. Eine solche Möglichkeit könnte mit dem Modell von Martin herausgefunden werden, während mit unserem System eine solche Substitution ausgeschlossen werden würde.

Der Nachteil dieser Methode im Vergleich zu der unsrigen ist, dass die Peptide, die T-Zellen aktivieren können, in der entstandenen Peptidmischung in nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Dadurch sind die Aktivierungen der T-Zellen sehr gering. Eventuell ist die Aktivierung so gering, dass sie nicht messbar ist und somit als negativ gewertet wird. Ein Grund für so einen Effekt könnte beispielsweise sein, dass sich bei der Synthese der Peptide bestimmte Aminosäuren besser mit dem entstehenden Peptid verbinden als andere und somit die Mischungen nicht aus wirklich zufälligen Aminosäuresubstitutionen besteht. Die Konzentration der aktivierenden Peptide könnte somit geringer sein als die der nicht aktivierenden.

Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass antagonistische Peptide eine Aktivierung der T-Zellen durch agonistische Peptide verhindern und somit zu falsch negativen Ergebnissen führen. Antagonistische Peptide nennt man Peptide, die eine Bindung mit dem T-Zellrezeptor und dem MHC-Molekül eingehen, die T-Zelle aber nicht aktivieren oder sogar eine spätere Aktivierung der Z-Zelle verhindern, sie also anerg machen. Dies muss aber nicht unbedingt ein Nachteil sein. Solche Peptide wurden mit dieser Methode sogar gesucht, um mit diesen „Peptid-Antagonisten“ Patienten mit multipler Sklerose zu behandeln[127].

Ein Vergleich zwischen beiden Supertopanalysen wurde allerdings noch nicht unternommen, wäre aber sehr wünschenswert. Vermutlich ergänzen sich beide

Methoden, so dass eine wirklich ausführliche Untersuchung eines T-Zellrezeptors beide Analysen durchführen müsste.

Die Frage ist allerdings, ob es so wichtig ist, eine so detaillierte Untersuchung eines T-Zellrezeptors vorzunehmen. Man könnte mit keiner Methode sicher sein, dass man wirklich alle kreuzreaktiven Peptide findet. Dazu müssten alle natürlich vorkommenden Peptide an den T-Zellen getestet werden, was praktisch unmöglich ist. Außerdem muss man sich angesichts des Faktums, dass T-Zellen kreuzreaktiv für sehr viele Peptide sind fragen, ob die Kenntnis aller Peptide, die autoreaktive T-Zellen aktivieren können, nützlich wäre.

5.1.6 Diskussion des verwendeten Mausmodells

Die Besonderheit des verwendeten Modells ist, dass die verwendeten Mäuse transgen für einen T-Zellrezeptor sind, der spezifisch an das Selbstpeptid MBP_{Ac1-11} des Myelin-basischen Proteins in Verbindung mit dem MHC-II Molekül I-A^u bindet. Da außerdem die endogenen T-Zellrezeptor α -Ketten ausgeschaltet sind, werden fast ausschließlich autoreaktive T-Zellen produziert[13,99].

Werden Mäuse dieses Stamms mit MBP_{Ac1-11} in kompletten Freund's Adjuvant und Pertussistoxin immunisiert, entwickelt sich die Autoimmunkrankheit EAE. Die alleinige Gabe von Adjuvant mit in Emulsion mit gepufferter Kochsalzlösung (PBS) plus Pertussistoxin ist nicht ausreichend, um Autoimmunität zu erzeugen[113].

Dies unterscheidet dieses Mausmodell von anderen transgenen Modellen für EAE, die spontan EAE entwickeln[105]. In einer Arbeit von Lafaille wird darauf hingewiesen, dass T-Zellen in transgenen Mäusen, die endogene β -Ketten exprimieren, dafür verantwortlich sind, dass Autoimmunität nicht spontan entsteht, denn bei Mäusen desselben Stamms, bei denen die β -Ketten ausgeschaltet sind, entsteht EAE spontan[13]. Ob diese Ergebnisse auf das von uns verwendete Tiermodell übertragbar ist, ist allerdings nicht gezeigt, denn der genetische Hintergrund der von Lafaille verwendeten Mäuse ist ein anderer als der gemischte genetische Hintergrund der von uns verwendeten Mäuse.

Der Vorteil eines Modells, in dem die Mäuse nicht spontan krank werden, besteht darin, dass die Wirkung einzelner Substanzen auf die Induktion von EAE gezielt untersucht werden kann. Ein transgen exprimierter T-Zellrezeptor hat für unsere Untersuchungen des weiteren den Vorteil, dass die *in vivo* Relevanz der gefundenen Peptide ohne störenden Einfluss anderer T-Zellrezeptoren untersucht werden kann. Auf der anderen Seite muss immer bedacht werden, dass durch die hohe Frequenz von autoreaktiven T-

Zellen eventuell Regulationsmechanismen außer Kraft gesetzt werden, die unter physiologischen Bedingungen Autoimmunität verhindern. Deswegen sind die in diesen Mäusen ermittelten Befunde nicht ohne weiteres auf Organismen mit normalem T-Zellrepertoire übertragbar.

5.2 Aussagen über Bystander-Aktivierung

5.2.1 Definition der Bystander-Aktivierung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von LPS auf CD4-Zellen untersucht. Es wurde angenommen, dass LPS nicht direkt, sondern über „Bystander-Aktivierung“ auf CD4⁺-T-Zellen wirkt.

Unter Bystander-Aktivierung wird in dieser Arbeit verstanden, dass durch Substanzen (hier LPS) Zellen angeregt werden, die daraufhin Zytokine oder andere immunstimulatorische Substanzen exprimieren und synthetisieren, woraufhin andere Zellen (hier CD4⁺-Zellen), die ursprünglich nicht durch die Substanz stimuliert wurden, durch die Zytokine aktiviert werden. Wesentlich für die Definition von „Bystander-Aktivierung“ speziell bei T-Zellen ist, dass eine solche Aktivierung T-zellrezeptorunabhängig ist.

Als Hypothese zum Entstehen von Autoimmunität als infektionsabhängiger Mechanismus, der jedoch auch Exazerbationen durch unspezifische Erkrankungen erklären kann, wird Bystander-Aktivierung diskutiert[94,128].

Es sind bisher allerdings nur wenige Studien veröffentlicht worden, dass Bystander-Aktivierung alleine ausreicht, um eine Aktivierung auszulösen. Diese Experimente wurden auch hauptsächlich an murinen CD8⁺-Zellen oder an humanen CD4⁺-Zellen durchgeführt.

Auf der andern Seite wurden viele Daten publiziert, die zeigen, dass LPS als Adjuvant eine T-Zellantwort verstärken kann.

Auf die bekannten Befunde zu Bystander-Aktivierung soll im Folgenden näher eingegangen werden.

5.2.1.1 Untersuchungen zu Bystander-Aktivierung an murinen T-Zellen

Murine CD8⁺ -T-Zellen, also zytotoxische T-Zellen, die nach dem klassischen Verständnis genau wie CD4⁺-Zellen ausschließlich über ihren T-Zellrezeptor aktiviert

werden, können nach mehreren Untersuchungen auch über Bystander-Aktivierung stimuliert werden.

Es gab sogar eine Untersuchung, die bei einer kultivierten CD8⁺-T-Zelllinie eine Subpopulation von 1-3% CD8⁺-T-Zellen fand, die nach LPS-Stimulation direkt, also ohne Einfluss von anderen Zelltypen, proliferierte[129]. Aufgrund der langen Kultur der Linie ist unwahrscheinlich, dass es sich bei den proliferierenden Zellen um B-Zellkontaminationen oder andere Zellen handelt. Auf der anderen Seite sind Zelllinien aufgrund der langen Zeit in Zellkultur stets sehr artifizielle Systeme. Dass also ein direkter Einfluss von LPS auf CD8⁺-T-Zellen auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielt, kann also durch diese Untersuchung nicht geklärt werden.

Dass murine CD8⁺-Zellaktivierung durch Bystander-Aktivierung *in vivo* eine Rolle spielt, wurde durch mehrere Arbeiten von Tough et al. gezeigt. Erstens konnte gezeigt werden, dass eine T-Zellproliferation durch Injektion mit viralen Bestandteilen (dsRNA) CD8⁺-T-Zellen zur Proliferation angeregt werden konnten[130]. Zur Induktion von Proliferation der CD8⁺-T-Zellen war eine Injektion der Mäuse mit Interferon-I ausreichend.

Außerdem wurde festgestellt, dass sich die Reaktion von Gedächtnis-T-Zellen, die nach Stimulation mit Zytokinen proliferierten, von der Reaktion von naiven CD8⁺-T-Zellen unterscheidet[63]. Naive CD8⁺-T-Zellen exprimieren nur Aktivierungsmarker nach Zytokinstimulation ohne zu proliferieren, wohingegen Gedächtniszellen auch proliferieren.

In einer weiteren Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass auch LPS, also eine bakterielle Substanz, CD8⁺-T-Zellen *in vivo* zur Proliferation anregt[131]. In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von LPS auf CD4⁺-T-Zellen untersucht. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde eine Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen anhand von einer Expression von Aktivierungsmarkern, speziell CD69, festgestellt. Jedoch wurde eine signifikante Proliferation von CD4⁺-T-Zellen nicht gefunden.

Diese scheinbar konkurrierenden Ergebnisse können darauf zurückzuführen sein, dass in der Arbeit von Tough et al. die Hintergrundproliferation der CD4⁺-T-Zellen, bedingt durch die Nachweismethode mit BrdU *in vivo*, sehr hoch war (etwa 30%). Dementsprechend wurde auch eine geringe Steigerung der Proliferation der CD4⁺-T-Zellen gefunden, in Anbetracht der hohen Hintergrundproliferation ist diese allerdings nicht signifikant.

Diese Ergebnisse wurden in dem Sinne diskutiert, dass die Bystander-Aktivierung zur Homöostase der T-Zellen, also als Stimulus für eine Regeneration besonders der Gedächtniszellen, benötigt wird. In einer anderen Arbeit wurde dieser Mechanismus der Homöostase der CD8⁺-T-Zellen durch Bystander-Aktivierung näher untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass IL-15 für diesen Mechanismus benötigt wird[132].

Ein Zusammenhang zwischen den CD8⁺-T-Zellaktivierungen und Autoimmunität wurde allerdings nicht gefunden.

5.2.1.2 Untersuchungen zu Bystander-Aktivierung an humanen CD4⁺-Zellen

Mehrere Untersuchungen wurden zum Einfluss von Bystander-Aktivierung bei humanen CD4⁺ T-Zellen durchgeführt.

Es wurden, ebenso wie bei murinen CD8⁺-T-Zellen, Zytokine gefunden, die ohne gleichzeitige Ligation des T-Zellrezeptors in der Lage sind, Proliferation von CD4⁺-T-Zellen hervorzurufen.

Zum einen wurde gezeigt, dass eine Mischung aus IL-2, TNF- α und IL-6 sowohl naive (CD45RA⁺) als auch voraktivierte (CD45RO⁺) CD4⁺-T-Zellen *in vitro* zur Proliferation anregen kann[133]. Interessanterweise blieb dabei der naive Phänotyp erhalten, so dass dies dafür spricht, dass, wenn dieser Mechanismus *in vivo* eine Rolle spielt, am ehesten die Homöostase der T-Zellen beeinflusst und keinen wirklichen immunstimulatorischen Effekt auf die T-Zellen ausübt.

Des weiteren konnten in einer anderen Arbeit verschiedene Zytokinkombinationen unterschiedliche Proliferationen von entweder naiven CD4⁺-T-Zellen oder speziellen Subpopulationen von Gedächtnis-CD4⁺-T-Zellen auslösen, so dass dies auch hier dafür spricht, dass Bystander-Aktivierung *in vivo* für eine Homöostase unterschiedlicher T-Zellpopulationen sorgen könnte[134].

Bei humanen CD4⁺-T-Zellen wurde außerdem gezeigt, dass LPS Proliferation hervorrufen kann[135,136]. In einer dieser Arbeiten[136] wurde die Art der T-Zellaktivierung untersucht, und im Gegensatz zu der murinen CD8⁺-T-Zellaktivierung scheinen nicht Zytokine, sondern direkte Zell-Zellkontakte mit Monozyten und eine Kostimulation mit B7/CD28 benötigt zu werden. Eine Ligation des T-Zellrezeptors ist aber nicht notwendig, so dass es sich auch hier um eine Form von Bystander-Aktivierung handelt.

Die Ergebnisse der Arbeiten über Aktivierung humaner CD4⁺-T-Zellen durch Bystander-Aktivierung wurden aus offensichtlichen Gründen sämtlich *in vitro* durchgeführt, was eine Aussage über die Konsequenz unter physiologischen Bedingungen einschränkt. Somit kann hier keine Aussage darüber getroffen werden, ob Autoimmunität durch diesen Mechanismus hervorgerufen werden kann.

5.2.1.3 Einfluss von LPS auf murine CD4⁺-T-Zellen – Adjuvante Wirkung

Während es nur sehr wenige Untersuchungen zur Frage einer Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen ausschließlich durch Bystander-Aktivierung, also ohne jegliche Ligation des T-Zellrezeptors, gibt, wurde durch viele Untersuchungen deutlich, dass zum einen T-Zellen den Effekt anderer Zelltypen auf LPS-Stimulation verstärken, und zum anderen, dass auch T-zellspezifische Funktionen durch LPS verstärkt werden können.

Dass T-Zellen die adjuvante Wirkung von LPS auf andere Zelltypen, speziell auf B-Zellen, verstärken, wurde bereits in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts untersucht. Dabei wurde einmal die Antikörperproduktion nach LPS-Gabe mit oder ohne T-Zellen untersucht[137], außerdem wurde der Effekt von LPS auf B-Zellen untersucht, wenn T-Zellen von LPS-unempfindlichen Mäusen oder von LPS-empfindlichen Mäusen zugegeben wurden[138,139]. Es wurde deutlich, dass Th-Zellen von LPS-empfindlichen Mäusen benötigt werden, um eine vollständige Aktivierung von B-Zellen durch LPS zu erreichen.

Dass LPS auch CD4⁺-T-Zellspezifische Funktionen verstärken kann, wurde 1989 in einem Tiermodell für EAE gezeigt[140]. Lewis-Ratten wurden entweder Milzzellen transferiert, die zuvor mit Antigen oder mit LPS plus Antigen kultiviert wurden. Dabei konnte LPS die Inzidenz und den Schweregrad der EAE erheblich (um das 5-fache) verstärken.

In vitro wurde außerdem festgestellt, dass die Zugabe von LPS CD4⁺-T-Zellproliferation schon bei Antigenkonzentrationen hervorruft, die nicht ausreichen, um CD4⁺-T-Zellen ohne LPS zur Proliferation anzuregen[141].

T-Zellen verstärken also den LPS-Effekt auf andere Zellen, also beispielsweise die Antikörperproduktion durch B-Zellen, LPS wirkt aber auch als Adjuvant für T-Zellen.

5.2.2 Bystander-Aktivierung als Auslöser CD4⁺-T-Zellvermittelter Autoimmunität

Während es wenig Daten zu *in vitro*-Effekten von Bystander-Aktivierung auf murine CD4⁺-T-Zellen gibt, gibt es zwei Arbeiten, die *in vivo*-Effekte auf CD4⁺-T-zellinduzierte Autoimmunität untersuchen.

In einer Arbeit wurde die Ursache einer Diabetes mellitus-Induktion durch Coxsackie B4-Virus Infektion in verschiedenen Mausstämmen untersucht. Dabei war die Diabetes-Induktion nicht an bestimmte MHC-Moleküle verknüpft, von denen bekannt ist, dass durch sie kreuzreaktive Peptide zwischen dem Virus und den pankreatischen Inseln präsentiert werden, sondern an selbstreagierenden T-Zellen, die nicht mit dem Virus kreuzreagieren[142]. Da sich das Virus im Pankreas repliziert und in jedem Mausstamm eine Pankreatitis aufgrund der provozierten Immunantwort hervorruft, wird geschlussfolgert, dass nicht die molekulare Mimikry, sondern das Freisetzen von Antigenen durch die Immunreaktion und die anschließende Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen für das Auslösen von autoimmunem Diabetes mellitus verantwortlich ist.

Zu dieser Arbeit ist zu sagen, dass zwar die T-zellvermittelte Autoimmunität durch die Aktivierung hervorgerufen wird, die Autoimmunität hervorrufenden T-Zellen jedoch direkt über ihren T-Zellrezeptor aktiviert werden. Demnach handelt es sich nicht um „Bystander-Aktivierung“ im engeren Sinne, sondern eher um T-Zellaktivierung durch Zusammenbruch immunologischer Schranken („Bystander Damage“).

In einer zweiten Untersuchung wurde stromale Keratitis durch Herpesviren ausgelöst. Allerdings wird diese Form der stromalen Keratitis durch T-Zellen induziert, auch wenn sie nicht responsibel gegen Herpesviren sind[143]. Die verwendeten Mäuse sind auf einem SCID-Hintergrund transgen für einen OVA-Peptid-spezifischen T-Zellrezeptor. Die T-Zellen dieser Mäuse konnten nicht durch Antigene von Herpesviren aktiviert werden. Eine Inokkulation von Viren in die Augen der Mäuse löste stromale Keratitis aus, solange die Viren sich replizierten (Inaktivierung der Viren durch Aciclovir verhinderte die stromale Keratitis). SCID-Mäuse, die keinerlei T-Zellen besitzen, entwickeln nach Inokkulation keinerlei Keratitis, womit gezeigt ist, dass es sich um eine T-zellabhängige Erkrankung handelt. Ein Transfer von T-Zellen in SCID-Mäuse führte zur Entwicklung von stromaler Keratitis, wenn die T-Zellen vorher durch OVA-Peptid aktiviert wurden.

Als weiteren Hinweis, dass es sich um Bystander-Aktivierung von T-Zellen handelt, wurde gezeigt, dass Cyclosporin A, einem Pharmakon, das die Expression

insbesondere die Freisetzung von Interleukin 2 und damit eine T-Zellrezeptor-induzierte Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen hemmt, die Induktion der stromalen Keratitis nicht beeinflussen konnte, aber die Keratitis konnte durch Rapamycin therapiert werden, einem Pharmakon, welches unter anderem die Interaktion von T-Zellen mit multiplen Zytokinen hemmt.

Nach diesen Daten wird die Erkrankung durch T-Zellen induziert. Jedoch werden die T-Zellen nicht über ihren T-Zellrezeptor, sondern wahrscheinlich über Zytokine aktiviert. Es handelt sich also um Autoimmunität durch Bystander-Aktivierung.

Ein Unterschied zu der in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Definition zur Hypothese der „Bystander-Aktivierung“ ist, dass eine Autoreaktivität der T-Zellen offensichtlich nicht benötigt wird, es reicht, wenn T-Zellen beliebiger Spezifität die Inflammation unterhalten. Was in diesem Falle die Wirkungsweise der T-Zellen ist, ist allerdings noch nicht untersucht.

Diese zwei Beispiele, die meiner Kenntnis nach die einzigen Beispiele sind, in denen eine Induktion von Autoimmunität durch „Bystander-Aktivierung“ gezeigt wurde, machen zum einen deutlich, dass der Begriff „Bystander-Aktivierung“ sehr unterschiedlich definiert wird. Jedoch macht auch besonders das zweite Beispiel deutlich, dass es Indizien für ein tatsächliches Vorkommen von solcherart ausgelöster Autoimmunität gibt, auch wenn es selbstverständlich fraglich ist, inwieweit „Bystander-Aktivierung“ als Ursache von Autoimmunität unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielt (siehe Abschnitt 5.3).

5.2.3 Bystander-Aktivierung – Ergebnisse dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde Bystander-Aktivierung an murinen CD4⁺-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Im folgenden wird auf die Ergebnisse eingegangen.

5.2.3.1 *In vitro Effekte der Lysate und LPS*

5.2.3.1.1 Proliferation durch LPS und bakteriellen Lysaten

Ein wesentlicher Marker immunologischer Aktivierung ist die Messung der Proliferation der aktivierten Zellen. Wichtig war nun, zu untersuchen, wie stark CD4⁺ T-Zellen auf Stimulation mit LPS reagieren. Bisher wurden nur Ergebnisse publiziert, die bei murinen CD4⁺ T-Zellen eine LPS-Stimulation durch induzieren von kostimulierenden Molekülen

als verstärkend einer Th-Zellantwort beschrieben. Diese Stimulation war aber nicht hinreichend, um eine Proliferation der Th-Zellen auszulösen.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden CD4⁺-T-Zellen mit 5(6)-Carboxyfluoresceindiazetatsuccinimidylester (CFSE)[108] gefärbt. und durchflusszytometrisch untersucht. Wir beobachteten eine Proliferation von etwa einem Prozent Th-Zellen auf LPS. Die Problematik der experimentellen Auswertung soll der Übersichtlichkeit halber weiter unten diskutiert werden.

Falls nur ein Prozent der Th-Zellen auf LPS proliferiert, stellt sich die Frage, ob dies eine physiologische Relevanz besitzen könne. Da unter physiologischen Bedingungen nur ein Bruchteil der T-Zellen ein spezielles Antigen erkennt und eine suffiziente Immunantwort hervorruft, sollte bei den von uns verwendeten transgenen Mäusen eine Aktivierung von einem Prozent der T-Zellen einer sehr starken Immunreaktion eines physiologischen T-Zellsystems entsprechen. Somit ist unter diesen Bedingungen auch plausibel, dass es zu einer Reaktion gegen das ZNS kommt, da sämtliche T-Zellen, die aktiviert wurden, auch gegen das Autoantigen MBP reagieren.

Unter physiologischen Bedingungen könnte aber aus demselben Grund Autoimmunität durch LPS unwahrscheinlich sein: Da die T-Zellaktivierung antigenunabhängig ist und somit T-Zellen unterschiedlicher Spezifität betrifft, sind die Frequenzen der T-Zellen einer Spezifität für die Induktion einer Autoimmunität eventuell zu gering.

Hypothetisch könnte es aber sein, dass unter Bedingungen, bei denen die Frequenzen spezifischer T-Zellen bereits hoch sind (z.B. bestehende Autoimmunität oder chronisch bzw. rezidivierender Infektion) diese T-Zellen durch LPS aktiviert werden.

Im negativen Fall (d.h. einer bereits bestehenden Autoimmunität) würde dies einen akuten Schub der Erkrankung bedeuten, wie dies zum Beispiel bei Patienten mit Multipler Sklerose beobachtet wird, wenn sie einen Schub nach einem Infekt erleiden.

Im positiven Fall (d.h. einer chronischen oder rezidivierender Infektionen) könnte dieser Mechanismus aber eventuell bewirken, dass T-Zellen bei erneutem Befall oder Exazerbation einer bestehenden Infektion antigenunabhängig aktiviert werden und schneller reagieren, da der Vorgang der Antigenprozessierung und –präsentation nicht benötigt wird.

5.2.3.1.2 Probleme der Auswertung dieser Experimente

Wie in Abschnitt 4.5.2.1 gezeigt, proliferieren etwas mehr CD4⁺ T-Zellen nach Zugabe von LPS oder Lysaten von *Salmonella typhimurium* zu Milzzellkulturen als nach Zugabe von PBS. Auch wenn es sich nur um einen Unterschied von etwa einem Prozent

handelt, ist dieses Ergebnis rein statistisch gesehen signifikant und war reproduzierbar (zur statistischen Auswertung siehe 4.5.2.1).

Die statistische Signifikanz ist bei einer durchflusszytometrischen Analyse allerdings gut zu erreichen, da es sich stets um sehr viele Ereignisse handelt, die untersucht werden. So wurden bei standardmäßigen durchflusszytometrischen Analyse zur Untersuchung solch geringer Unterschiede in der Proliferation bis zu 1 Million Zellen aufgenommen. Die Standardabweichung bei zweimaliger Messung einer Probe oder Durchführung mehrerer Proben einer Substanz unterscheiden sich erfahrungsgemäß nur sehr gering voneinander, so dass selbst geringe Unterschiede der Proliferation statistisch signifikant sind.

Auch das Durchführen mehrerer Experimente bestätigten diese Unterschiede in der Größenordnung von einem Prozent, so dass auch hier eine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte.

Während die statistische Signifikanz also besteht, ist die sehr viel wichtigere Frage, ob ein systematischer Fehler in diesen Messungen vorkommt.

Ein großes Problem ist das Ausschließen von unspezifischen Bindungen. Da sehr viele B-Zellen und Makrophagen nach Zugabe von LPS proliferieren, würde selbst eine geringe unspezifische Bindung von CD4-Antikörper zu einer messbaren Proliferation von Zellen kommen, die nicht CD4-Zellen sind, aber als CD4-Zellen angefärbt wurden. Diese würden in der Auswertung eine geringe Proliferation von CD4-Zellen vortäuschen, die nicht vorhanden ist.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden alle Proben für durchflusszytometrische Analysen mit anti-Fc γ -Rezeptor und Ratten IgG geblockt. Allerdings ist durch einen solchen Block nicht auszuschließen, dass es trotzdem zu unspezifischen Bindungen kommt.

Es wurde versucht, dieses Problem zu eliminieren, indem einmal positiv auf CD4 gefärbt und andererseits negativ auf B220 oder ähnlicher Oberflächenmoleküle gefärbt wurde. B220 gefärbte Zellen wurden nicht mitbeurteilt, so dass Zellen, die unspezifisch Antikörper binden, CD4 und B220 positiv wären und nicht in die Auswertung einfließen. Aufgrund dieser Maßnahmen ist unwahrscheinlich, dass es sich bei den vorliegenden Ergebnissen bezüglich der CD4-Proliferation auf LPS nur um ein Artefakt handelt. Außerdem wurde im Folgenden nach anderen Markern für die Th-Zellaktivierung nach LPS-Stimulation gesucht.

Ein anderes Problem ist, dass CD4 nicht ausschließlich auf Th-Zellen vorkommt, sondern beispielsweise auch auf dendritischen Zellen, die auf LPS reagieren. Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Zellen um solche Zellen handelt, führten wir verschiedene Kontrollfärbungen durch, die unser Ergebnis, dass Th-Zellen auf LPS reagieren, bestätigten. Diese Kontrollfärbungen bestanden in der Doppelfärbung CD3 und CD4, in der Färbung der β -Kette des transgenen T-Zellrezeptors mit einem Antikörper gegen V β 8 zusammen mit CD4 und schließlich in der Färbung eines klonotypischen Antikörpers gegen den transgenen T-Zellrezeptor und CD4. Diese Färbungen schließen mit großer Sicherheit aus, dass es sich um andere, spezifisch angefärbte Zelltypen handelt.

5.2.3.2 *Beeinflussung von Oberflächenmolekülen*

Zur Untersuchung der Frage, ob LPS noch andere Effekte auf Th-Zellen bewirkt, und da die Fraktion an Zellen, die proliferieren, sehr klein ist, war es sehr wichtig, andere Aktivierungsmarker zu untersuchen.

Wir untersuchten die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 (die α -Kette des IL-2 Rezeptors) und CD62L (L-Selektin). CD25 wird von aktivierten T-Zellen exprimiert, wohingegen CD62L von naiven T-Zellen besonders stark exprimiert wird und aktivierte Zellen diesen Marker nur sehr wenig exprimieren. Da beide Marker bei Aktivierung entgegengesetzt reagieren, kann man auch den Einfluss von unspezifischen Bindungen begrenzen, wenn man den Anteil an Zellen untersucht, bei denen CD25 vermehrt und CD62L vermindert exprimiert werden. Bei unspezifischen Bindungen von Antikörper würde man vermuten, dass sowohl CD25 als auch CD62L verstärkt exprimiert werden, da beide Antikörper gebunden werden sollten.

Bei den Untersuchungen dieser Aktivierungsmarker wurde klar, dass sehr viel mehr T-Zellen ihr Profil der Aktivierungsmarker ändern als proliferieren. Es ist bekannt, dass T-Zellen empfindlicher mit Änderungen der Aktivierungsmarker als mit Zytokinproduktion oder Proliferation reagieren[123]. Bei unseren Experimenten zeigt sich, dass durch LPS sehr viele Th-Zellen (etwa 90%) ihren naiven (CD62L^{hi}CD25⁻) Phänotyp verlieren, aber von diesen Th-Zellen nur sehr wenig proliferieren. Es scheint also, dass LPS für die meisten Th-Zellen ein eher schwacher Induktor für Aktivierung ist. Auf der anderen Seite sind noch zu wenig Untersuchungen gemacht worden, um zu beurteilen, ob sich

die durch LPS aktivierten Th-Zellen von durch schwache antigenspezifische Stimuli aktivierten Th-Zellen phänotypisch unterscheiden.

Insbesondere CD62L als besonders empfindlich reagierender Marker zeigte eine starke Änderung auf LPS-Gabe. Bei der Negativkontrolle waren in dem gezeigten Experiment 54% der T-Zellen CD62L-positiv, wohingegen nur 5,4% der T-Zellen positiv waren, wenn sie mit LPS stimuliert wurden. Dieses repräsentative und reproduzierbare Ergebnis macht deutlich, dass es zu einer Aktivierung von T-Zellen kommt, denn ein so deutliches Ergebnis lässt sich durch eine unspezifische Bindung von Antikörpern nicht erklären.

Die Hochregulierung von CD25 war wiederum nicht sehr ausgeprägt, aber dennoch deutlicher als die Proliferation von T-Zellen auf LPS-Stimulation. Von den „naiven“ T-Zellen nach PBS-Stimulation exprimierten 5% CD25 auf ihrer Oberfläche. Nach LPS-Gabe erhöhte sich dieser Anteil auf 7,5%. Auch dies zeigt, dass die Aktivierung von T-Zellen durch LPS wie ein schwacher antigenspezifischer Stimulus wirkt.

5.2.4 Ergebnisse von Bystander-Aktivierung *in vivo*

5.2.4.1 Induktion von EAE durch Lysate und LPS

Die Untersuchung der Proliferation und der Oberflächenmoleküle *in vitro* ergaben eine schwache Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen. In unserem Modell war es möglich, die Relevanz dieser Aktivierung auch *in vivo* zu untersuchen. Dazu wurden die T⁺α⁻-Mäuse mit LPS oder bakteriellen Lysaten subkutan immunisiert. Wie auf Seite 68 gezeigt, entwickelten die Mäuse Lähmungen, die etwas schwächer ausgeprägt waren als Lähmungen nach MBP-Peptid Applikation. Die induzierte EAE unterschied sich aber signifikant von der Negativkontrolle mit PBS.

Somit ist LPS in der Lage, in den von uns verwendeten transgenen Mäusen, wo annähernd alle T-Zellen einen T-Zellrezeptor exprimieren, EAE zu induzieren. Die Frage, in wieweit dies tatsächlich durch „Bystander-Aktivierung“ oder andere Mechanismen geschieht, wird weiter unten diskutiert.

5.2.4.2 Hypothesen zum Entstehen der Autoimmunität durch LPS

Wie auf Seite 25 beschrieben, wird den CD4⁺-T-Zellen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese von EAE zugeschrieben. In Zusammenhang mit den *in vitro* Versuchen, die weiter oben in dieser Arbeit besprochen wurden, ist es also möglich, dass durch das

LPS die Zellen der angeborenen Immunität und die B-Zellen proliferieren, Zytokine produzieren und diese die T-Zellen antigenunabhängig aktivieren.

In unserem Modell mit sehr hohen Frequenzen von autoreaktiven T-Zellen käme es dann zu einer antigenunabhängigen Aktivierung dieser autoreaktiven Zellen, die nun als aktivierte Zellen in das ZNS gelangen und EAE auslösen. Ein solcher Mechanismus ist auf Seite 21 als „Bystander-Aktivierung“ diskutiert worden. Das Interessante an einem solchen Mechanismus wäre, dass Bakterien, ohne dass sie Peptidhomologien oder Peptidähnlichkeiten mit körpereigenen Proteinen besitzen, Autoimmunität über T-Zellen hervorrufen könnten, wenn die T-Zellen autoreaktiv sind.

Epidemiologisch gibt es auf der anderen Seite Belege, dass Schübe von Multipler Sklerose gehäuft nach Infektionen auftreten[144,145]. Dabei ist aber kein Beleg gefunden worden, der die Induktion von Schüben auf einen bestimmten Erreger zurückführen kann. Somit ist es wahrscheinlich, dass ein antigenunabhängiger Stimulus für diese Exazerbation der Multiplen Sklerose verantwortlich ist. Ein solcher antigenunabhängiger Stimulus wäre die Aktivierung von Th-Zellen durch LPS oder andere unspezifische Aktivatoren des Immunsystems.

Allerdings muss auch in Betracht gezogen werden, dass die in dieser Arbeit gezeigten Daten diese Hypothese nicht vollständig belegen können.

Aufgrund unserer Daten ist nicht auszuschließen, dass andere Zellen des Immunsystems nach Applikation von LPS ins ZNS wandern, oder dass das LPS selbst über die Blutbahn zum ZNS gelangt und es hier durch den einen oder den anderen Mechanismus zu einer geringgradigen Inflammation im ZNS kommt. Für einen Effekt auf die Blut-Hirn-Schranke durch LPS auch nach subkutaner Applikation von LPS gibt es Hinweise von anderen Gruppen, wobei sich die Auswirkungen von LPS bei unterschiedlichen Mausstämmen stark unterscheiden[146,147,148]. Eine solche Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke könnte zu Migration von Th-Zellen in das ZNS und zu Freisetzung von MBP führen, so dass es zu einer Aktivierung der Th-Zellen und letztendlich EAE entsteht.

Die abschließende Klärung dieser Frage könnte über ein Modell geklärt werden, bei dem durch LPS stimulierte und anschließend gereinigte CD4⁺-T-Zellen passive EAE hervorgerufen wird. Dieses Modell konnte allerdings in unserem System nicht etabliert werden.

5.3 Ausblick: Autoimmunität durch Bakterien

Abschließend bleibt zu diskutieren, inwieweit die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen, ob also durch „Kreuzreaktivität“ oder „Bystander-Aktivierung“ tatsächlich Autoimmunität ausgelöst werden kann.

In Anbetracht der Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten[59,60,61,113,115,116,117] ist anzunehmen, dass Kreuzreaktivität tatsächlich ein sehr häufig vorkommendes Phänomen ist. In dieser Arbeit wurden kreuzreaktive Peptide systematisch gesucht, ohne dass speziell nach Bakterien gesucht wurde, die eventuell mit MS in Zusammenhang stehen. Auf diese Weise wurden auch mikrobielle Peptide identifiziert, die in ubiquität vorkommenden Bakterien synthetisiert werden. Somit halten wir es für eher unwahrscheinlich, dass „Kreuzreaktivität“ ein alleiniger Grund beim Entstehen von Autoimmunität ist. Unter diesem Aspekt sind viele Arbeiten zu sehen, die Zusammenhänge zwischen speziellen Bakterien und Autoimmunkrankheiten postulieren: Die meisten dieser Arbeiten suchen gezielt nach Peptiden in einem bestimmten Bakterien und einem bestimmten Organ, die kreuzreaktiv T-Zellklone aktivieren können. Allerdings ist nach unseren Ergebnissen davon auszugehen, dass es nicht sehr unwahrscheinlich ist, eine solche Kreuzreaktivität zu finden, da ein solcher Befund nicht sehr spezifisch ist.

Demgegenüber steht die Frage, ob die gefundenen Peptide auch tatsächlich *in vivo* aus den Proteinen prozessiert werden, oder ob die Ursprungsproteine in einer Konzentration vorkommen, die ausreichend ist, um eine immunologische Reaktion hervorzurufen. Sicherlich kommen sehr viele der gefundenen Peptide *in vivo* aus diesem Grunde nicht vor. Wie bereits auf Seite 72 beschrieben, gibt es für ein anderes Modell[61] zumindest ein Beispiel, das zweifelsfrei zeigt, dass ein bakterielles, immundominantes T-Zellepitop von *Borrelia burgdorferi* mit einem humanem immundominanten Epitop des Proinsulins kreuzreagiert. Jedoch ist keinerlei Assoziation zwischen einer Borrelieninfektion und Diabetes mellitus Typ 1 beschrieben. Auch ist zu bedenken, dass in allen Untersuchungen die Menge von kreuzreagierenden Peptiden unterschätzt wird, und es sehr viele verschiedene T-Zellrezeptoren unter physiologischen Bedingungen gibt. Es ist meines Erachtens also wahrscheinlich, dass von den kreuzreaktiven Peptiden einige prozessiert werden.

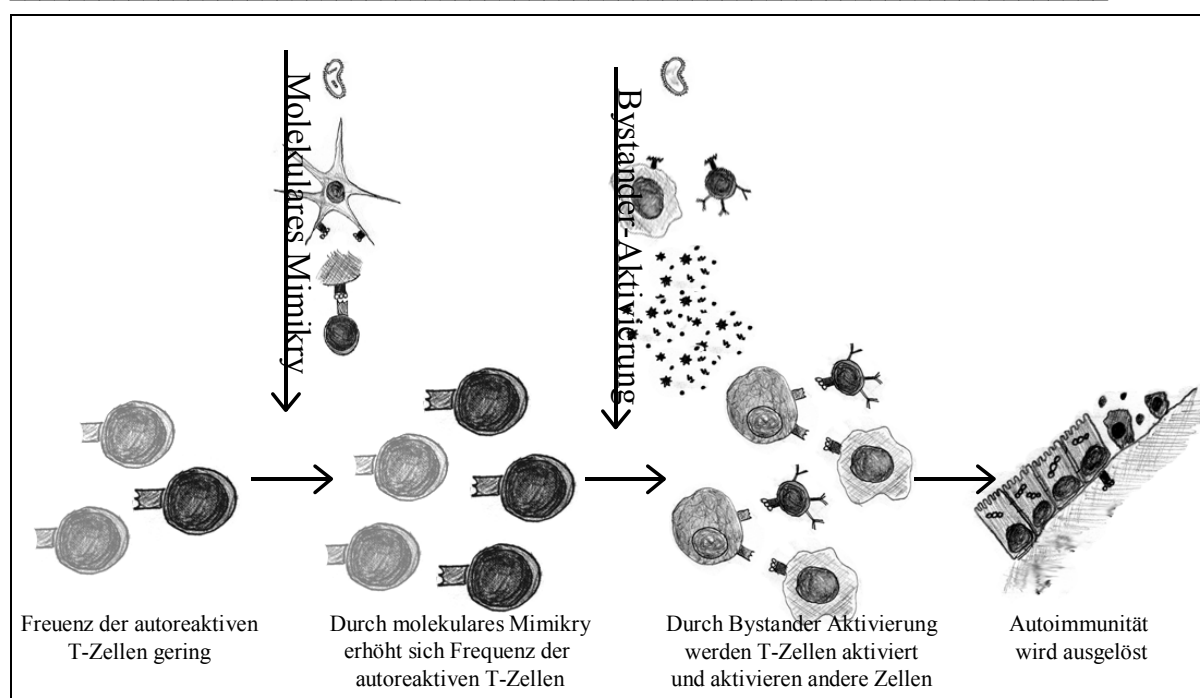


Abbildung 16: Hypothetische Induktion von Autoimmunität durch Molekulare Mimikry und Bystander-Aktivierung. Obwohl auch im gesunden Individuum autoreaktive T-Zellen vorhanden sind, ist deren Frequenz normalerweise zu gering, um eine klinisch manifeste Autoimmunität hervorzurufen. Bei Infektion mit Bakterien, die kreuzreaktive Peptide enthalten, könnten diese T-Zellen proliferieren. Bei rezidivierender oder chronischer Infektion würde deren Frequenz im Gesamtrepertoire besonders zunehmen. Ab einer bestimmten Frequenz würde dann ein Reiz wie eine unspezifische Aktivierung durch Bystander-Aktivierung ausreichen, um Autoimmunität auszulösen. Kreuzreaktive Peptide in den Bakterien wären nicht mehr nötig, um Exazerbationen hervorzurufen. In einem solchen Modell würde eine Behandlung von spezifischen Infektionen bei bereits bestehender Autoimmunität keine wesentliche Wirkung erzielen. Es käme auf unspezifische Infektionsverhütung an, wie dies auch klinisch beschrieben ist. Nach diesem Modell kämen auch Assoziationen zwischen bestimmten Infektionen und Autoimmunität vor, in diesen Krankheitserregern kämen kreuzreaktive Peptide vor. Da es allerdings nach unseren Befunden viele Infektionserreger mit kreuzreaktiven Peptiden geben sollte, würden Assoziationen nicht nur zwischen einer Infektion und einer Autoimmunkrankheit gefunden werden, sondern mehrere Infektionen könnten zu dem Entstehen von Autoimmunität beitragen. Auch dies wird klinisch gefunden.

Eine weitere Frage ist, ob die T-Zellen, wenn sie von Bakterien aktiviert wurden und mit einem bestimmten Selbstpeptid kreuzreagieren, noch in einer Frequenz vorkommen, die ausreicht, um Autoimmunität hervorzurufen. Es könnte zum Beispiel sein, dass bei einem Erkennen von Infektionserregern durch sehr viele T-Zellen verschiedener Spezifität jede individuelle T-Zelle mit einem Selbstpeptid kreuzreagiert. Wenn aber jede T-Zelle ein anderes Selbstpeptid erkennt, würden die für eine suffiziente Immunantwort ausreichende Frequenzen an aktivierten T-Zellen nur an dem Infektionserreger, nicht aber an den im ganzen Körper verteilten Selbstpeptiden erreicht.

Des weiteren untersuchten wir die Hypothese der „Bystander-Aktivierung“. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu „Bystander-

Aktivierung“ von T-Zellen kommen kann. Allerdings gilt auch hier: Wenn LPS alleine Autoimmunität auslösen könnte, wenn autoreaktive T-Zellen vorhanden sind, wären autoimmune Erkrankungen sehr viel häufiger. Wie bereits erwähnt, werden auch in gesunden Individuen autoreaktive T-Zellen gefunden, und LPS ist eine Substanz, die ubiquitär vorkommt. Als alleiniger Auslöser sollte somit auch der Mechanismus der „Bystander-Aktivierung“ nicht in Betracht kommen.

Allerdings ist bekannt, dass Schübe von autoimmunen Erkrankungen ausgelöst werden können, wenn es zu einer Infektion kommt[149]. Bei diesen Prozessen, wenn sich also eine Autoimmunität gerade bildet oder bereits gebildet hat, autoreaktive T-Zellen also in hoher Konzentration im Blut vorhanden sind, dann können diese T-Zellen eventuell über einen der diskutierten Mechanismen aktiviert werden und eine Verstärkung der Erkrankung bewirken.

Ein hypothetischer Mechanismus, wie Autoimmunität dennoch durch beide Mechanismen unter physiologischen Bedingungen ausgelöst werden könnte, wird in Abbildung 16 dargestellt. Bei chronischer oder repetetiver Infektion mit einem Erreger könnte es zur Akkumulation von T-Zellen einer Spezifität und somit einer Kreuzreaktivität kommen. Werden diese T-Zellen jetzt aktiviert, beispielsweise durch „Bystander-Aktivierung“, könnte Autoimmunität ausgelöst werden. Aufgrund der Tatsache, dass innerhalb des Verständnisses des Immunsystems der Spezifität der T-Zellen eine sehr große Rolle zukommt, wäre es sehr interessant, zu untersuchen, inwieweit es verhindert wird, dass es unter physiologischen Bedingungen nicht zu Autoimmunität kommt, obwohl, wie diskutiert, der T-Zellrezeptor flexibler ist als bisher gedacht und obwohl T-Zellen eventuell auch unspezifisch aktiviert werden können. Eine interessante, wenn auch spekulative, Diskussion wurde darüber von Mason geführt[125] (siehe auch Seite 75). Allerdings ist eine Beantwortung dieser Fragen derzeit nicht möglich, auch wenn einer solchen bei dem Verständnis des Funktionierens des physiologischen Abwehrprozesses von Fremdorganismen in meinen Augen eine sehr große Rolle zukäme.

6 Zusammenfassung: Infektion und Autoimmunität

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Bakterien für das Entstehen von Autoimmunität untersucht. Insbesondere wurde untersucht, inwieweit Bakterien entweder spezifisch (über „Kreuzreaktivität“) oder antigenunabhängig (über „Bystander-Aktivierung“) eine Aktivierung von autoreaktiven CD4⁺-T-Zellen induzieren können.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei dem untersuchten, MBP-spezifischen T-Zellrezeptor multiple, natürlich vorkommende, kreuzreaktive Peptide mikrobiellen Ursprungs gibt, die eine Aktivierung der T-Zellen hervorrufen und *in vivo* EAE induzieren können.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit LPS als unspezifischer Aktivator des Immunsystems eine Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen *in vitro* hervorrufen kann und inwieweit *in vivo* EAE durch LPS hervorgerufen werden kann.

Es wurde gezeigt, dass LPS *in vitro* einen kleinen Anteil der CD4⁺ - T-Zellen aktiviert.

Wurden den transgenen T⁺α⁻-Mäusen LPS appliziert, erkrankten diese an EAE.

Somit gibt es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in den T⁺α⁻-Mäusen Hinweise für eine Relevanz von „Bystander-Aktivierung“.

Abschließend wurde diskutiert, inwieweit entweder „Kreuzreaktivität“ oder „Bystander-Aktivierung“ als Auslöser für Autoimmunität unter physiologischen Bedingungen in Frage kommt. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse wurde postuliert, dass keine der beiden Mechanismen alleiniger Auslöser sei, da es aufgrund der Häufigkeit von Infektionen, kreuzreaktiven Peptiden und des Vorkommens von autoreaktiven T-Zellen auch in gesunden Individuen ansonsten sehr viel häufiger zu Autoimmunität kommen müsste.

Referenzen

- [1] Remlinger P. (1905): Accidents paralytiques au cours du traitement antirabiques, Annales de l'institut Pasteur 19, Seite 625-646.
- [2] von Behring, E. und Kitasato, S. (1991): [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890], Mol.Immunol. 28 [12], Seite 1317, 1319-1317, 1320. URL: PM:1749380
- [3] Tauber, A. I. (1991): The immunological self: a centenary perspective, Perspect.Biol.Med. 35 [1], Seite 74-86. URL: PM:1780218
- [4] Wright, A. E.; Douglas, S. R. und Sanderson, J. B. (1989): An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis. 1903, Rev.Infect.Dis. 11 [5], Seite 827-834. URL: PM:2682954
- [5] Gibson T. und Medawar P.B. (1943): The fate of skin homografts in man, Journal of Anatomy 77, Seite 299-314.
- [6] Zhang, W.; Young, A. C.; Imarai, M.; Nathenson, S. G. und Sacchettini, J. C. (1992): Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2Kb molecule containing a single viral peptide: implications for peptide binding and T-cell receptor recognition, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89 [17], Seite 8403-8407. URL: PM:1325657
- [7] Stern, L. J.; Brown, J. H.; Jardetzky, T. S.; Gorga, J. C.; Urban, R. G.; Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1994): Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide, Nature 368 [6468], Seite 215-221. URL: PM:8145819
- [8] Madden, D. R.; Gorga, J. C.; Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1991): The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation, Nature 353 [6342], Seite 321-325. URL: PM:1922337
- [9] Janeway, C. A., Jr. (1992): The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation, Annu.Rev.Immunol. 10, Seite 645-674. URL: PM:1534242
- [10] Germain, R. N. (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation, Cell 76 [2], Seite 287-299. URL: PM:8293464
- [11] Kurts, C.; Heath, W. R.; Carbone, F. R.; Allison, J.; Miller, J. F. und Kosaka, H. (1996): Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo, J.Exp.Med. 184 [3], Seite 923-930. URL: PM:9064352
- [12] von Boehmer, H. und Hafen, K. (1986): Minor but not major histocompatibility antigens of thymus epithelium tolerize precursors of cytolytic T cells, Nature 320 [6063], Seite 626-628. URL: PM:3486368
- [13] Olivares-Villagomez, D.; Wang, Y. und Lafaille, J. J. (1998): Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis, J.Exp.Med. 188 [10], Seite 1883-1894. URL: PM:9815266
- [14] Van de, Keere F. und Tonegawa, S. (1998): CD4(+) T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice, J.Exp.Med. 188 [10], Seite 1875-1882. URL: PM:9815265
- [15] Mombaerts, P.; Clarke, A. R.; Rudnicki, M. A.; Iacomini, J.; Itohara, S.; Lafaille, J. J.; Wang, L.; Ichikawa, Y.; Jaenisch, R.; Hooper, M. L. und . (1992): Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages, Nature 360 [6401], Seite 225-231. URL: PM:1359428
- [16] Snodgrass, H. R.; Dembic, Z.; Steinmetz, M. und von Boehmer, H. (1985): Expression of T-cell antigen receptor genes during fetal development in the thymus, Nature 315 [6016], Seite 232-233. URL: PM:3873615
- [17] Raulet, D. H.; Garman, R. D.; Saito, H. und Tonegawa, S. (1985): Developmental regulation of T-cell receptor gene expression, Nature 314 [6006], Seite 103-107. URL: PM:2983227
- [18] von Boehmer, H.; Kishi, H.; Uematsu, Y.; Teh, H. S.; Scott, B. und Kisielow, P. (1988): T cell repertoire selection in T cell receptor transgenic mice, Princess Takamatsu Symp. 19, Seite 107-113. URL: PM:3151987
- [19] Kaye, J.; Hsu, M. L.; Sauron, M. E.; Jameson, S. C.; Gascoigne, N. R. und Hedrick, S. M. (1989): Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor, Nature 341 [6244], Seite 746-749. URL: PM:2571940
- [20] Berg, L. J.; Pullen, A. M.; Fazekas de St, Groth B.; Mathis, D.; Benoist, C. und Davis, M. M. (1989): Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand, Cell 58 [6], Seite 1035-1046. URL: PM:2476238

- [21] Teh, H. S.; Kisielow, P.; Scott, B.; Kishi, H.; Uematsu, Y.; Bluthmann, H. und von Boehmer, H. (1988): Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T- cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells, *Nature* 335 [6187], Seite 229-233. URL: PM:2970593
- [22] Amakawa, R.; Hakem, A.; Kundig, T. M.; Matsuyama, T.; Simard, J. J.; Timms, E.; Wakeham, A.; Mittrucker, H. W.; Griesser, H.; Takimoto, H.; Schmits, R.; Shahinian, A.; Ohashi, P.; Penninger, J. M. und Mak, T. W. (1996): Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice, *Cell* 84 [4], Seite 551-562. URL: PM:8598042
- [23] Kishimoto, H.; Surh, C. D. und Sprent, J. (1998): A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo, *J.Exp.Med.* 187 [9], Seite 1427-1438. URL: PM:9565635
- [24] Castro, J. E.; Listman, J. A.; Jacobson, B. A.; Wang, Y.; Lopez, P. A.; Ju, S.; Finn, P. W. und Perkins, D. L. (1996): Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes, *Immunity*. 5 [6], Seite 617-627. URL: PM:8986720
- [25] Nagata, S. und Suda, T. (1995): Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations, *Immunol.Today* 16 [1], Seite 39-43. URL: PM:7533498
- [26] Zinkernagel, R. M.; Bachmann, M. F.; Kundig, T. M.; Oehen, S.; Pirchet, H. und Hengartner, H. (1996): On immunological memory, *Annu.Rev.Immunol.* 14, Seite 333-367. URL: PM:8717518
- [27] Swain, S. L.; Hu, H. und Huston, G. (1999): Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors, *Science* 286 [5443], Seite 1381-1383. URL: PM:10558997
- [28] Garcia, S.; DiSanto, J. und Stockinger, B. (1999): Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation, *Immunity*. 11 [2], Seite 163-171. URL: PM:10485651
- [29] Paterson (1960): Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells, *Journal of Experimental Medicine* 111, Seite 119-133.
- [30] Panitch, H. S. und McFarlin, D. E. (1977): Experimental allergic encephalomyelitis: enhancement of cell-mediated transfer by concanavalin A, *J.Immunol.* 119 [3], Seite 1134-1137. URL: PM:302272
- [31] Pettinelli, C. B. und McFarlin, D. E. (1981): Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes, *J.Immunol.* 127 [4], Seite 1420-1423. URL: PM:6168690
- [32] Buschard, K. und Rygaard, J. (1977): Passive transfer of streptozotocin induced diabetes mellitus with spleen cells. Studies of syngeneic and allogeneic transfer to normal and athymic nude mice, *Acta Pathol.Microbiol.Scand.[C.]* 85C [6], Seite 469-472. URL: PM:305189
- [33] Buschard, K.; Madsbad, S. und Rygaard, J. (1978): Passive transfer of diabetes mellitus from man to mouse, *Lancet* 1 [8070], Seite 908-910. URL: PM:76848
- [34] Derbinski, J.; Schulte, A.; Kyewski, B. und Klein, L. (2001): Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self, *Nat.Immunol.* 2 [11], Seite 1032-1039. URL: PM:11600886
- [35] The Finnish-German APECED Consortium. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (1997): An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. The Finnish-German APECED Consortium. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy, *Nat.Genet.* 17 [4], Seite 399-403. URL: PM:9398840
- [36] Nagamine, K.; Peterson, P.; Scott, H. S.; Kudoh, J.; Minoshima, S.; Heino, M.; Krohn, K. J.; Lalioti, M. D.; Mullis, P. E.; Antonarakis, S. E.; Kawasaki, K.; Asakawa, S.; Ito, F. und Shimizu, N. (1997): Positional cloning of the APECED gene, *Nat.Genet.* 17 [4], Seite 393-398. URL: PM:9398839
- [37] Anderson, M. S.; Venzani, E. S.; Klein, L.; Chen, Z.; Berzins, S. P.; Turley, S. J.; von Boehmer, H.; Bronson, R.; Dierich, A.; Benoist, C. und Mathis, D. (2002): Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein, *Science* 298 [5597], Seite 1395-1401. URL: PM:12376594
- [38] Fritz, R. B. und Kalvakolanu, I. (1995): Thymic expression of the golli-myelin basic protein gene in the SJL/J mouse, *J.Neuroimmunol.* 57 [1-2], Seite 93-99. URL: PM:7535793
- [39] Campagnoni, A. T.; Pribyl, T. M.; Campagnoni, C. W.; Kampf, K.; Amur-Umarjee, S.; Landry, C. F.; Handley, V. W.; Newman, S. L.; Garbay, B. und Kitamura, K. (1993): Structure and developmental regulation of Golli-mbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain, *J.Biol.Chem.* 268 [7], Seite 4930-4938. URL: PM:7680345
- [40] Brinkman, C. J.; Nillesen, W. M.; Hommes, O. R.; Lamers, K. J.; de Pauw, B. E. und Delmotte, P. (1982): Cell-mediated immunity in multiple sclerosis as determined by sensitivity of different lymphocyte populations to various brain tissue antigens, *Ann.Neurol.* 11 [5], Seite 450-455. URL: PM:6179459
- [41] Traugott, U.; Scheinberg, L. C. und Raine, C. S. (1979): Multiple sclerosis: circulating antigen-reactive lymphocytes, *Ann.Neurol.* 6 [5], Seite 425-429. URL: PM:92911

-
- [42] Wekerle, H.; Engelhardt, B.; Risau, W. und Meyermann, R. (1991): Interaction of T lymphocytes with cerebral endothelial cells in vitro, *Brain Pathol.* 1 [2], Seite 107-114. URL: PM:1727014
- [43] Pryce, G.; Male, D.; Campbell, I. und Greenwood, J. (1997): Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro, *J.Neuroimmunol.* 75 [1-2], Seite 84-94. URL: PM:9143241
- [44] Vajkoczy, P.; Laschinger, M. und Engelhardt, B. (2001): Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels, *J.Clin.Invest* 108 [4], Seite 557-565. URL: PM:11518729
- [45] Ferguson, T. A. und Griffith, T. S. (1997): A vision of cell death: insights into immune privilege, *Immunol.Rev.* 156, Seite 167-184. URL: PM:9176707
- [46] Fabry, Z.; Topham, D. J.; Fee, D.; Herlein, J.; Carlino, J. A.; Hart, M. N. und Sriram, S. (1995): TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo, *J.Immunol.* 155 [1], Seite 325-332. URL: PM:7602108
- [47] Aichele, P.; Bachmann, M. F.; Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (1996): Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection, *Immunol.Rev.* 152, Seite 21-45. URL: PM:8930666
- [48] Ohashi, P. S.; Oehen, S.; Buerki, K.; Pircher, H.; Ohashi, C. T.; Odermatt, B.; Malissen, B.; Zinkernagel, R. M. und Hengartner, H. (1991): Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice, *Cell* 65 [2], Seite 305-317. URL: PM:1901764
- [49] Schwartz, M. und Kipnis, J. (2002): Multiple sclerosis as a by-product of the failure to sustain protective autoimmunity: a paradigm shift, *Neuroscientist.* 8 [5], Seite 405-413. URL: PM:12374425
- [50] Yoles, E.; Hauben, E.; Palgi, O.; Agranov, E.; Gothilf, A.; Cohen, A.; Kuchroo, V.; Cohen, I. R.; Weiner, H. und Schwartz, M. (2001): Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma, *J.Neurosci.* 21 [11], Seite 3740-3748. URL: PM:11356861
- [51] Kwidzinski, E.; Mutlu, L. K.; Kovac, A. D.; Bunse, J.; Goldmann, J.; Mahlo, J.; Aktas, O.; Zipp, F.; Kamradt, T.; Nitsch, R. und Bechmann, I. (2003): Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model, *J.Neural Transm.Suppl* [65], Seite 29-49. URL: PM:12946047
- [52] Pette, M.; Fujita, K.; Wilkinson, D.; Altmann, D. M.; Trowsdale, J.; Giegerich, G.; Hinkkanen, A.; Epplen, J. T.; Kappos, L. und Wekerle, H. (1990): Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 [20], Seite 7968-7972. URL: PM:1700423
- [53] Martin, R.; Jaraquemada, D.; Flerlage, M.; Richert, J.; Whitaker, J.; Long, E. O.; McFarlin, D. E. und McFarland, H. F. (1990): Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals, *J.Immunol.* 145 [2], Seite 540-548. URL: PM:1694881
- [54] Ota, K.; Matsui, M.; Milford, E. L.; Mackin, G. A.; Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (1990): T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis, *Nature* 346 [6280], Seite 183-187. URL: PM:1694970
- [55] Brabb, T.; von Dassow, P.; Ordonez, N.; Schnabel, B.; Duke, B. und Gorman, J. (2000): In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity, *J.Exp.Med.* 192 [6], Seite 871-880. URL: PM:10993917
- [56] Hardardottir, F.; Baron, J. L. und Janeway, C. A., Jr. (1995): T cells with two functional antigen-specific receptors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 [2], Seite 354-358. URL: PM:7530361
- [57] Padovan, E.; Casorati, G.; Dellabona, P.; Meyer, S.; Brockhaus, M. und Lanzavecchia, A. (1993): Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells, *Science* 262 [5132], Seite 422-424. URL: PM:8211163
- [58] Zal, T.; Weiss, S.; Mellor, A. und Stockinger, B. (1996): Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 [17], Seite 9102-9107. URL: PM:8799161
- [59] Wucherpfennig, K. W. und Strominger, J. L. (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein, *Cell* 80 [5], Seite 695-705. URL: PM:7534214
- [60] Hemmer, B.; Fleckenstein, B. T.; Vergelli, M.; Jung, G.; McFarland, H.; Martin, R. und Wiesmuller, K. H. (1997): Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone, *J.Exp.Med.* 185 [9], Seite 1651-1659. URL: PM:9151902
- [61] Maier, B.; Molinger, M.; Cope, A. P.; Fugger, L.; Schneider-Mergener, J.; Sonderstrup, G.; Kamradt, T. und Kramer, A. (2000): Multiple cross-reactive self-ligands for *Borrelia burgdorferi*-specific HLA-DR4-restricted T cells, *Eur.J.Immunol.* 30 [2], Seite 448-457. URL: PM:10671200
- [62] Bachmaier, K.; Neu, N.; de la Maza, L. M.; Pal, S.; Hessel, A. und Penninger, J. M. (1999): Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry, *Science* 283 [5406], Seite 1335-1339. URL: PM:10037605

- [63] Tough, D. F.; Sun, S.; Zhang, X. und Sprent, J. (1999): Stimulation of naive and memory T cells by cytokines, *Immunol.Rev.* 170, Seite 39-47. URL: PM:10566140
- [64] Vergelli, M.; Hemmer, B.; Utz, U.; Vogt, A.; Kalbus, M.; Tranquill, L.; Conlon, P.; Ling, N.; Steinman, L.; McFarland, H. F. und Martin, R. (1996): Differential activation of human autoreactive T cell clones by altered peptide ligands derived from myelin basic protein peptide (87-99), *Eur.J.Immunol.* 26 [11], Seite 2624-2634. URL: PM:8921948
- [65] Tourbah, A.; Gout, O.; Liblau, R.; Lyon-Caen, O.; Bougniot, C.; Iba-Zizen, M. T. und Cabanis, E. A. (1999): Encephalitis after hepatitis B vaccination: recurrent disseminated encephalitis or MS?, *Neurology* 53 [2], Seite 396-401. URL: PM:10430433
- [66] Herroelen, L.; de Keyser, J. und Ebinger, G. (1991): Central-nervous-system demyelination after immunisation with recombinant hepatitis B vaccine, *Lancet* 338 [8776], Seite 1174-1175. URL: PM:1682594
- [67] Marshall, E. (1998): A shadow falls on hepatitis B vaccination effort, *Science* 281 [5377], Seite 630-631. URL: PM:9714670
- [68] Ascherio, A.; Zhang, S. M.; Hernan, M. A.; Olek, M. J.; Coplan, P. M.; Brodovicz, K. und Walker, A. M. (2001): Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis, *N.Engl.J.Med.* 344 [5], Seite 327-332. URL: PM:11172163
- [69] Sievers, E. J. und Heyneman, C. A. (2002): Relationship between vaccinations and multiple sclerosis, *Ann.Pharmacother.* 36 [1], Seite 160-162. URL: PM:11816245
- [70] Zipp, F. und Wandinger, K. P. (2001): [Current concepts on vaccinations in multiple sclerosis], *Nervenarzt* 72 [10], Seite 802-806. URL: PM:11688184
- [71] DeKruyff, R. H.; Gieni, R. S. und Umetsu, D. T. (1997): Antigen-driven but not lipopolysaccharide-driven IL-12 production in macrophages requires triggering of CD40, *J.Immunol.* 158 [1], Seite 359-366. URL: PM:8977211
- [72] Ding, L. und Shevach, E. M. (1996): Activated B cells express CD28/B7-independent costimulatory activity, *J.Immunol.* 157 [4], Seite 1389-1396. URL: PM:8759718
- [73] Hathcock, K. S.; Laszlo, G.; Pucillo, C.; Linsley, P. und Hodes, R. J. (1994): Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function, *J.Exp.Med.* 180 [2], Seite 631-640. URL: PM:7519245
- [74] Rivers T.M.; Sprunt D.H. und Berry G.P. (1933): Observation on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys, *Journal of Experimental Medicine* 58, Seite 39-53.
- [75] Lee, J. M. und Olitsky, P. K. (1955): Simple method for enhancing development of acute disseminated encephalitis in mice, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 89, Seite 263.
- [76] Olitsky P.K. und Yager R.H. (1949): Experimental Disseminated Encephalomyelitis in White Mice, *Journal of Experimental Medicine*, Seite 213-223.
- [77] Stuart, G. und Krikorian, K. S. (1928): The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment, *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 22, Seite 327-377.
- [78] Gonatas, N. K. und Howard, J. C. (1974): Inhibition of experimental allergic encephalomyelitis in rats severely depleted of T cells, *Science* 186 [4166], Seite 839-841. URL: PM:4143378
- [79] Ortiz-Ortiz, L. und Weigle, W. O. (1976): Cellular events in the induction of experimental allergic encephalomyelitis in rats, *J.Exp.Med.* 144 [3], Seite 604-616. URL: PM:60461
- [80] Traugott, U.; McFarlin, D. E. und Raine, C. S. (1986): Immunopathology of the lesion in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse, *Cell Immunol.* 99 [2], Seite 395-410. URL: PM:3093105
- [81] Brostoff, S. W. und White, T. M. (1986): Treatment of clinical experimental allergic encephalomyelitis in the rat with monoclonal antibodies, *J.Neuroimmunol.* 13 [2], Seite 233-240. URL: PM:3097072
- [82] Brostoff, S. W. und Mason, D. W. (1984): Experimental allergic encephalomyelitis: successful treatment in vivo with a monoclonal antibody that recognizes T helper cells, *J.Immunol.* 133 [4], Seite 1938-1942. URL: PM:6236260
- [83] Lando, Z. und Ben Nun, A. (1984): Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by T-cell line. II. Specific requirements and the role of pertussis vaccine for the in vitro activation of the cells and induction of disease, *Clin.Immunol.Immunopathol.* 30 [2], Seite 290-303. URL: PM:6198119
- [84] Madsen, L. S.; Andersson, E. C.; Jansson, L.; Krogsgaard, M.; Andersen, C. B.; Engberg, J.; Strominger, J. L.; Svejgaard, A.; Hjorth, J. P.; Holmdahl, R.; Wucherpfennig, K. W. und Fugger, L. (1999): A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T- cell receptor, *Nat.Genet.* 23 [3], Seite 343-347. URL: PM:10610182
- [85] Goverman, J. (1999): Tolerance and autoimmunity in TCR transgenic mice specific for myelin basic protein, *Immunol.Rev.* 169, Seite 147-159. URL: PM:10450515
- [86] Brown, A. M. und McFarlin, D. E. (1981): Relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse, *Lab Invest* 45 [3], Seite 278-284. URL: PM:6792424

-
- [87] Martin, R.; McFarland, H. F. und McFarlin, D. E. (1992): Immunological aspects of demyelinating diseases, *Annu.Rev.Immunol.* 10, Seite 153-187. URL: PM:1375472
- [88] Kabat E.A.; Wolf A. und Bezer A.E. (1946): The Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Heterologous and Homologous Brain Tissue with Adjuvants, *Journal of Experimental Medicine*, Seite 117-129.
- [89] Falb, D.; Briner, T. J.; Sunshine, G. H.; Bourque, C. R.; Luqman, M.; Gefter, M. L. und Kamradt, T. (1996): Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy, *Eur.J.Immunol.* 26 [1], Seite 130-135. URL: PM:8566055
- [90] Jones, L. A.; Chin, L. T.; Longo, D. L. und Kruisbeek, A. M. (1990): Peripheral clonal elimination of functional T cells, *Science* 250 [4988], Seite 1726-1729. URL: PM:2125368
- [91] Matzinger, P. (1994): Tolerance, danger, and the extended family, *Annu.Rev.Immunol.* 12, Seite 991-1045. URL: PM:8011301
- [92] Linthicum, D. S.; Munoz, J. J. und Blaskett, A. (1982): Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system, *Cell Immunol.* 73 [2], Seite 299-310. URL: PM:6891621
- [93] Bergman, R. K.; Munoz, J. J. und Portis, J. L. (1978): Vascular permeability changes in the central nervous system of rats with hyperacute experimental allergic encephalomyelitis induced with the aid of a substance from Bordetella pertussis, *Infect.Immun.* 21 [2], Seite 627-637. URL: PM:211087
- [94] Kamradt, T.; Soloway, P. D.; Perkins, D. L. und Gefter, M. L. (1991): Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein, *J.Immunol.* 147 [10], Seite 3296-3302. URL: PM:1719074
- [95] Taub, R. N.; Rosett, W.; Adler, A. und Morse, S. I. (1972): Distribution of labeled lymph node cells in mice during the lymphocytosis induced by Bordetella pertussis, *J.Exp.Med.* 136 [6], Seite 1581-1593. URL: PM:4345107
- [96] Morse, S. I. und Barron, B. A. (1970): Studies on the leukocytosis and lymphocytosis induced by Bordetella pertussis. 3. The distribution of transfused lymphocytes in pertussis-treated and normal mice, *J.Exp.Med.* 132 [4], Seite 663-672. URL: PM:4323778
- [97] Zamvil, S. S.; Nelson, P. A.; Mitchell, D. J.; Knobler, R. L.; Fritz, R. B. und Steinman, L. (1985): Encephalitogenic T cell clones specific for myelin basic protein. An unusual bias in antigen recognition, *J.Exp.Med.* 162 [6], Seite 2107-2124. URL: PM:2415664
- [98] Zamvil, S.; Nelson, P.; Trotter, J.; Mitchell, D.; Knobler, R.; Fritz, R. und Steinman, L. (1985): T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination, *Nature* 317 [6035], Seite 355-358. URL: PM:2413363
- [99] Lafaille, J. J.; Nagashima, K.; Katsuki, M. und Tonegawa, S. (1994): High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice, *Cell* 78 [3], Seite 399-408. URL: PM:7520367
- [100] Meyer, A. L.; Trollmo, C.; Crawford, F.; Marrack, P.; Steere, A. C.; Huber, B. T.; Kappler, J. und Hafler, D. A. (2000): Direct enumeration of Borrelia-reactive CD4 T cells ex vivo by using MHC class II tetramers, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 [21], Seite 11433-11438. URL: PM:11005833
- [101] Gallimore, A.; Glithero, A.; Godkin, A.; Tissot, A. C.; Pluckthun, A.; Elliott, T.; Hengartner, H. und Zinkernagel, R. (1998): Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes, *J.Exp.Med.* 187 [9], Seite 1383-1393. URL: PM:9565631
- [102] Murali-Krishna, K.; Altman, J. D.; Suresh, M.; Sourdive, D. J.; Zajac, A. J.; Miller, J. D.; Slansky, J. und Ahmed, R. (1998): Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection, *Immunity.* 8 [2], Seite 177-187. URL: PM:9491999
- [103] Fathman, C. G. und Frelinger, J. G. (1983): T-lymphocyte clones, *Annu.Rev.Immunol.* 1, Seite 633-655. URL: PM:6242467
- [104] Kohler, G. und Milstein, C. (1992): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975, *Biotechnology* 24, Seite 524-526. URL: PM:1422065
- [105] Goverman, J.; Woods, A.; Larson, L.; Weiner, L. P.; Hood, L. und Zaller, D. M. (1993): Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity, *Cell* 72 [4], Seite 551-560. URL: PM:7679952
- [106] Kimoto, M. und Fathman, C. G. (1980): Antigen-reactive T cell clones. I. Transcomplementing hybrid I-A-region gene products function effectively in antigen presentation, *J.Exp.Med.* 152 [4], Seite 759-770. URL: PM:6158548
- [107] Baron, J. L.; Madri, J. A.; Ruddle, N. H.; Hashim, G. und Janeway, C. A., Jr. (1993): Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma, *J.Exp.Med.* 177 [1], Seite 57-68. URL: PM:7678116

- [108] Hansson, Y.; Jacobson, E.; Ortlund, J.; Paulie, S. und Perlmann, P. (1987): A rapid method for detection of cellular proliferation using carboxyfluorescein. Assay of growth factors (IL-2, IL-1) and growth inhibiting antibodies, *J.Immunol.Methods* 100 [1-2], Seite 261-267. URL: PM:3036952
- [109] Kramer, A. und Schneider-Mergener, J. (1998): Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports, *Methods Mol.Biol.* 87, Seite 25-39. URL: PM:9523256
- [110] Pearson, C. I.; Gautam, A. M.; Rulifson, I. C.; Liblau, R. S. und McDevitt, H. O. (1999): A small number of residues in the class II molecule I-Au confer the ability to bind the myelin basic protein peptide Ac1-11, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 [1], Seite 197-202. URL: PM:9874795
- [111] Mason, K.; Denney, D. W., Jr. und McConnell, H. M. (1995): Myelin basic protein peptide complexes with the class II MHC molecules I-Au and I-Ak form and dissociate rapidly at neutral pH, *J.Immunol.* 154 [10], Seite 5216-5227. URL: PM:7537302
- [112] Bairoch, A.; Bucher, P. und Hofmann, K. (1997): The PROSITE database, its status in 1997, *Nucleic Acids Res.* 25 [1], Seite 217-221. URL: PM:9016539
- [113] Grogan, J. L.; Kramer, A.; Nogai, A.; Dong, L.; Ohde, M.; Schneider-Mergener, J. und Kamradt, T. (1999): Cross-reactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice, *J.Immunol.* 163 [7], Seite 3764-3770. URL: PM:10490973
- [114] Lafaille, J. J.; Keere, F. V.; Hsu, A. L.; Baron, J. L.; Haas, W.; Raine, C. S. und Tonegawa, S. (1997): Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease, *J.Exp.Med.* 186 [2], Seite 307-312. URL: PM:9221760
- [115] Kersh, G. J. und Allen, P. M. (1996): Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands, *J.Exp.Med.* 184 [4], Seite 1259-1268. URL: PM:8879197
- [116] Reay, P. A.; Kantor, R. M. und Davis, M. M. (1994): Use of global amino acid replacements to define the requirements for MHC binding and T cell recognition of moth cytochrome c (93-103), *J.Immunol.* 152 [8], Seite 3946-3957. URL: PM:7511662
- [117] Bhardwaj, V.; Kumar, V.; Geysen, H. M. und Sercarz, E. E. (1993): Degenerate recognition of a dissimilar antigenic peptide by myelin basic protein-reactive T cells. Implications for thymic education and autoimmunity, *J.Immunol.* 151 [9], Seite 5000-5010. URL: PM:7691962
- [118] Kuon, W.; Holzhutter, H. G.; Appel, H.; Grolms, M.; Kollnberger, S.; Traeder, A.; Henklein, P.; Weiss, E.; Thiel, A.; Lauster, R.; Bowness, P.; Radbruch, A.; Kloetzel, P. M. und Sieper, J. (2001): Identification of HLA-B27-restricted peptides from the Chlamydia trachomatis proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases, *J.Immunol.* 167 [8], Seite 4738-4746. URL: PM:11591805
- [119] He, X. L.; Radu, C.; Sidney, J.; Sette, A.; Ward, E. S. und Garcia, K. C. (2002): Structural snapshot of aberrant antigen presentation linked to autoimmunity: the immunodominant epitope of MBP complexed with I-Au, *Immunity.* 17 [1], Seite 83-94. URL: PM:12150894
- [120] Liu, G. Y. und Wraith, D. C. (1995): Affinity for class II MHC determines the extent to which soluble peptides tolerize autoreactive T cells in naive and primed adult mice--implications for autoimmunity, *Int.Immunol.* 7 [8], Seite 1255-1263. URL: PM:7495732
- [121] Kassiotis, G.; Garcia, S.; Simpson, E. und Stockinger, B. (2002): Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells, *Nat.Immunol.* 3 [3], Seite 244-250. URL: PM:11836529
- [122] Germain, R. N.; Stefanova, I. und Dorfman, J. (2002): Self-recognition and the regulation of CD4+ T cell survival, *Adv.Exp.Med.Biol.* 512, Seite 97-105. URL: PM:12405192
- [123] Carter, L. L.; Zhang, X.; Dubey, C.; Rogers, P.; Tsui, L. und Swain, S. L. (1998): Regulation of T cell subsets from naive to memory, *J.Immunother.* 21 [3], Seite 181-187. URL: PM:9610909
- [124] London, C. A.; Lodge, M. P. und Abbas, A. K. (2000): Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells, *J.Immunol.* 164 [1], Seite 265-272. URL: PM:10605020
- [125] Mason, D. (1998): A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T- cell receptor, *Immunol.Today* 19 [9], Seite 395-404. URL: PM:9745202
- [126] Stefferl, A.; Schubart, A.; Storch, M.; Amini, A.; Mather, I.; Lassmann, H. und Linington, C. (2000): Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J.Immunol.* 165 [5], Seite 2859-2865. URL: PM:10946319
- [127] Bielekova, B.; Goodwin, B.; Richert, N.; Cortese, I.; Kondo, T.; Afshar, G.; Gran, B.; Eaton, J.; Antel, J.; Frank, J. A.; McFarland, H. F. und Martin, R. (2000): Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand, *Nat.Med.* 6 [10], Seite 1167-1175. URL: PM:11017150

-
- [128] Benoist, C. und Mathis, D. (2001): Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry?, *Nat.Immunol.* 2 [9], Seite 797-801. URL: PM:11526389
- [129] Vogel, S. N.; Hilfiker, M. L. und Caulfield, M. J. (1983): Endotoxin-induced T lymphocyte proliferation, *J.Immunol.* 130 [4], Seite 1774-1779. URL: PM:6601137
- [130] Tough, D. F.; Borrow, P. und Sprent, J. (1996): Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo, *Science* 272 [5270], Seite 1947-1950. URL: PM:8658169
- [131] Tough, D. F.; Sun, S. und Sprent, J. (1997): T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS), *J.Exp.Med.* 185 [12], Seite 2089-2094. URL: PM:9182680
- [132] Lodolce, J. P.; Burkett, P. R.; Boone, D. L.; Chien, M. und Ma, A. (2001): T cell-independent interleukin 15 α signals are required for bystander proliferation, *J.Exp.Med.* 194 [8], Seite 1187-1194. URL: PM:11602647
- [133] Unutmaz, D.; Pileri, P. und Abrignani, S. (1994): Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination, *J.Exp.Med.* 180 [3], Seite 1159-1164. URL: PM:8064232
- [134] Geginat, J.; Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (2001): Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells, *J.Exp.Med.* 194 [12], Seite 1711-1719. URL: PM:11748273
- [135] Tulic, M. K.; Manoukian, J. J.; Eidelman, D. H. und Hamid, Q. (2002): T-cell proliferation induced by local application of LPS in the nasal mucosa of nonatopic children, *J.Allergy Clin.Immunol.* 110 [5], Seite 771-776. URL: PM:12417887
- [136] Ulmer, A. J.; Flad, H.; Rietschel, T. und Mattern, T. (2000): Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS), *Toxicology* 152 [1-3], Seite 37-45. URL: PM:11090938
- [137] Armerding, D. und Katz, D. H. (1974): Activation of T and B lymphocytes in vitro. I. Regulatory influence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on specific T-cell helper function, *J.Exp.Med.* 139 [1], Seite 24-43. URL: PM:4128447
- [138] Goodman, M. G. und Weigle, W. O. (1979): T cell regulation of polyclonal B cell responsiveness. I. Helper effects of T cells, *J.Immunol.* 122 [6], Seite 2548-2553. URL: PM:376737
- [139] McGhee, J. R.; Farrar, J. J.; Michalek, S. M.; Mergenhagen, S. E. und Rosenstreich, D. L. (1979): Cellular requirements for lipopolysaccharide adjuvanticity. A role for both T lymphocytes and macrophages for in vitro responses to particulate antigens, *J.Exp.Med.* 149 [4], Seite 793-807. URL: PM:372482
- [140] Hamada, T.; Driscoll, B. F.; Kies, M. W. und Alvord, E. C., Jr. (1989): LPS augments adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat, *Autoimmunity* 2 [4], Seite 275-284. URL: PM:2485079
- [141] More, S. H.; Breloer, M.; Fentz, A. K.; Fleischer, B. und von Bonin, A. (2002): 'Ignorance' of antigen-specific murine CD4+ and CD8+ T cells is overruled by lipopolysaccharide and leads to specific induction of IFN-gamma, *Scand.J.Immunol.* 55 [4], Seite 329-335. URL: PM:11967113
- [142] Horwitz, M. S.; Bradley, L. M.; Harbertson, J.; Krahl, T.; Lee, J. und Sarvetnick, N. (1998): Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry, *Nat.Med.* 4 [7], Seite 781-785. URL: PM:9662368
- [143] Deshpande, S.; Zheng, M.; Lee, S.; Banerjee, K.; Gangappa, S.; Kumaraguru, U. und Rouse, B. T. (2001): Bystander activation involving T lymphocytes in herpetic stromal keratitis, *J.Immunol.* 167 [5], Seite 2902-2910. URL: PM:11509638
- [144] Sibley, W. A.; Bamford, C. R. und Clark, K. (1985): Clinical viral infections and multiple sclerosis, *Lancet* 1 [8441], Seite 1313-1315. URL: PM:2860501
- [145] Edwards, S.; Zvartau, M.; Clarke, H.; Irving, W. und Blumhardt, L. D. (1998): Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 64 [6], Seite 736-741. URL: PM:9647301
- [146] Matsuda, M.; Tsukada, N.; Miyagi, K. und Yanagisawa, N. (1995): Adhesion of lymphocytes to endothelial cells in experimental allergic encephalomyelitis before and after treatment with endotoxin lipopolysaccharide, *Int.Arch.Allergy Immunol.* 106 [4], Seite 335-344. URL: PM:7719150
- [147] Kloss, C. U.; Bohatschek, M.; Kreutzberg, G. W. und Raivich, G. (2001): Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture, *Exp.Neurol.* 168 [1], Seite 32-46. URL: PM:11170719
- [148] Bohatschek, M.; Werner, A. und Raivich, G. (2001): Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency, *Exp.Neurol.* 172 [1], Seite 137-152. URL: PM:11681847
- [149] Rutschmann, O. T.; McCrory, D. C. und Matchar, D. B. (2002): Immunization and MS: a summary of published evidence and recommendations, *Neurology* 59 [12], Seite 1837-1843. URL: PM:12499473

Danksagung

Thomas Kamradt

Bert Maier
Marc Molinger
Carmen Infante-Duarte
Orissa Bender
Martin Baumgart
Johannes Falk
Christian Meisel
Michael Ahmadi

Kerstin Bonhagen
David Schubert
Tobias Nolden
Thordis Hohenstein
Volker Siffrin
Caspar Pfüller
Veronika Pampuch
Benjamin Vermeer

Manuela Ohde
Helmut Schäfer
und alle vom Tierstall

Christine Stadelmann
Andrea Keller
Wolfgang Brück

Ulrich Schaible

Andreas Radbruch

Meinen Eltern,
Hendrik, Kristin

und ganz besonders
Diana, Frederik und Jannik

„Wir untersuchen die Steine, aber nicht die Berge, wir haben das Material, beachten aber nicht, wie es zusammengehört.“

Alexander von Humboldt

Curriculum vitae von Axel Nogai

Zur Person

Name: Axel Nogai
Geburtsdatum: 3. August 1975
Geburtsort: Berlin
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Ausbildung

1982-1988 Besuch der Grundschule am Eichenwald in Berlin
1988-1995 Besuch der Freiherr-vom-Stein-Oberschule(Gymnasium)
Abitur am 02. Juni 1995 mit der Note 1,5
10/95-7/96 Ableistung des Wehrdienst
10/96-12/03 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität Berlin
19.8.1998 Physikum abgeschlossen mit der Note „gut“
23.3.1999 1. Staatsexamen abgeschlossen mit der Note „gut“
27.8.2002 2. Staatsexamen abgeschlossen mit der Note „gut“
28.11.2003 3. Staatsexamen abgeschlossen mit der Note „gut“

Veröffentlichungen und Kongresse

Grogan et al. (1999). Journal of Immunology, Oct. 1999, Vol. 163: S. 3764-3770
Nogai et al. „Bystander Activation of autoreactive T helper cells induces autoimmune disease“, Eingereicht im Journal of Immunology, Veröffentlichung in Revision
Nogai et al. (1999). Deutscher Immunologiekongreß, Hannover, Posterpräsentation
Nogai et al. (1999). European Student Conference, Berlin, Vortrag.
Nogai et al. (2000). Deutscher Immunologiekongreß, Düsseldorf, Vortrag
Nogai et al. (2000). European Student Conference, Berlin, Vortrag
Nogai et al. (2002). Annual International Ain Shams Medical Students' Congress, Cairo, Vortrag

Stipendien und Auszeichnungen

Apr. 1999 – Sep. 2000 Studentische Forschungsförderung der Charité
Okt. 1999 „Award for the most outstanding oral presentation in immunology at the 10th European Student Conference“, European Student Conference, Berlin
Nov. 2000 Auszeichnung für den besten Vortrag im Gebiet „Degenerative Brain Diseases“, European Student Conference, Berlin
Feb. 2002 „1st prize for free presentations“, Annual International Ain Shams Medical Students' Congress, Cairo

Das Forschungsvorhaben wurde über die gesamte Zeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 421, C2) gefördert und wurde in den jährlich stattfindenden Treffen meist durch Axel Nogai vertreten.

Seit 01.01.2004 Beschäftigt als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinischen Klinik III (Hämatologie/Onkologie) der Charité Campus Benjamin-Franklin

Selbständigkeitserklärung

Berlin, den 15. November 2004

Hiermit erkläre ich, Axel Nogai, geboren am 3. August 1975, dass diese Dissertation von mir selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Axel Nogai